SERGIU MĂNESCU

# MICRO-BIOLOGIE SANITARĂ

EDITURA MEDICALĂ

Sub redacția : S. MĂNESCU

Autori :

ANDRONACHE ELENA – medic primar I.I.S.P. București, BERINDEI AURORA – biolog principal I.I.S.P. București, BRĂILEANU MARIA – biolog principal I.I.S.P. București, CAZACU EUGEN – medic primar I.I.S.P. București, CERNESCU POMPILIA – biolog principal I.M.F. București, CHIVA ELENA – biolog. Cercetător științific principal I.I.S.P. București, CUCU MANOLE – medic primar, șef lucrări I.M.F. București, GHIȚESCU ELENA – biolog principal I.I.S.P. București, IEREMIA TIBERIU – profesor I.M.F. București, LAZĂR LUCIA – medic primar I.I.S.P. Cluj, MĂNESCU SERGIU – profesor, I.M.F. București, NIȚULESCU CONSTANTIN – medic primar, Șef laborator C.S.A. București, OPRIȘESCU DOINA – medic, Asistent I.M.F. București, ȘERBĂNESCU MARIA – medic principal, Asistent I.M.F. București, TOTESCU EUGEN – medic primar, șef laborator C.S.A. Constanța, VĂDINEANU ELENA – biolog cercetător științific I.I.S.P. București, ZAVATE OLGA – medic primar I.I S.P. Iași.

# MICROBIOLOGIE SANITARĂ

Scanned with OKEN Scanner

Redactor de carte : Dr. *M. TUNDREA*
Tehnoredactor : *GABRIEL STĂNCIOIU*

Bun de tipar : 16.05.1989
Formatul : 16/70×100
Hîrtie : Scris I A 70×100/55 g/m²
Coli de tipar : 23,25
ISBN 973-39-0020-6

Tiparul executat la I. P. „Oltenia"
Str. Mihai Viteazul nr. 4, Craiova
Comanda 380

Scanned with OKEN Scanner

# Cuprins


Pag.

Introducere . . . . . 11

1. **Microbiologia aerului, obiectelor și suprafețelor** (M. Cucu, Elena Andronache, Pompilia Cernescu, Olga Zavate) . . . . . 15

1.1. Originea microorganismelor din aer . . . . . 15

1.2. Natura microorganismelor din aer . . . . . 15

1.2.1. Clasificare și semnificație sanitară . . . . . 16

1.3. Rolul aerului în răspîndirea bolilor infecțioase . . . . . 16

1.3.1. Principalele boli aerogene . . . . . 16

1.3.2. Comportarea în atmosferă a microorganismelor patogene . . . 16

1.3.3. Proveniența germenilor patogeni din aer . . . . . 18

1.3.4. Forme de existență a germenilor patogeni din aer . . . . . 18

1.3.4.1. Picăturile de secreție nazală, buco-faringiană sau bronșică . 19

1.3.4.2. Nucleii de picătură . . . . . 19

1.3.4.3. Praful contaminat (pulberea bacteriferă) . . . . . 21

1.4. Mecanismul de infectare a organismului cu flora patogenă din aer . . 22

1.5. Indicații de aplicare a controlului microbiologic al aerului și norme . 23

1.5.1. Indicatorii bacteriologici de contaminare a aerului . . . . . 24

1.5.1.1. Numărul total de germeni din aer, care se dezvoltă la 37°C (flora mezofilă din aer) . . . . . 24

1.5.1.2. Streptococii hemolitici (β hemolitici) și viridans (α hemolitici) . . . . . 24

1.5.1.3. Stafilococii . . . . . 24

1.5.1.4. Germenii din grupul coliform . . . . . 25

1.5.1.5. Norme sanitare . . . . . 25

1.6. Contaminarea obiectelor și a suprafeței cutanate . . . . . 27

1.6.1. Contaminarea obiectelor cu agenți patogeni . . . . . 27

1.6.2. Contaminarea suprafeței cutanate . . . . . 29

1.7. Analiza microbiologică a aerului . . . . . 30

1.7.1. Metode de recoltare și însămînțare . . . . . 30

1.7.1.1. Metoda de recoltare prin sedimentare (Koch) . . . . . 31

1.7.1.2. Metodele de recoltare prin aspirație . . . . . 32

1.7.1.2.1. Metodele de filtrare . . . . . 32

1.7.1.2.2. Metodele de barbotare . . . . . 33

1.7.1.2.3. Metodele de impact . . . . . 33

1.7.1.2.4. Metoda electroprecipitării . . . . . 34

1.7.2. Determinarea indicatorilor microbiologici . . . . . 34




Scanned with OKEN Scanner

Pag.

1.7.2.1. Determinarea florei mezofile . . . . . 34
1.7.2.2. Determinarea streptococilor hemolitici . . . . . 34
1.7.2.3. Determinarea stafilococilor . . . . . 34
1.7.2.4. Determinarea coliformilor . . . . . 35
1.7.2.5. Determinarea fungilor din aer . . . . . 35
1.7.2.5.1. Determinarea sporilor de fungi din aerul atmosferic 35
1.7.2.5.2. Metoda sedimentării . . . . . 35
1.7.2.5.3. Metoda Koch . . . . . 36
1.7.2.5.4. Metoda aspirației . . . . . 36
1.7.2.5.5. Identificarea sporilor de fungi . . . . . 36
1.7.2.6. Determinarea genului Candida din aer . . . . . 37

1.8. Determinarea virusurilor din aer . . . . . 37
1.8.1. Recoltarea probelor de aer . . . . . 37
1.8.2. Prelucrarea probelor de aer. Concentrarea cu ajutorul polietilenglicolului (PEG) . . . . . 38

1.9. Metode de determinare a contaminării obiectelor și suprafeței cutanate . 39
1.9.1. Recoltarea și însămînțarea germenilor . . . . . 39
1.9.1.1. Metoda tamponului . . . . . 39
1.9.1.2. Metoda amprentelor . . . . . 40
1.9.1.3. Metoda peliculelor adezive . . . . . 40
1.9.1.4. Metoda spălării . . . . . 40
1.9.2. Determinarea indicatorilor microbiologici . . . . . 41
1.9.3. Determinarea fungilor de pe suprafețe . . . . . 41

2. **Microbiologia apei** (T. Eremia, Elena Brăileanu, Aurora Berindei, Elena Chiva, Elena Ghițescu, Lucia Lazăr) . . . . . 42

2.1. Apa ca factor de mediu. Modalități de poluare biologică a apei. Microorganisme patogene și potențial patogene transmisibile prin apă . . 42
2.1.1. Rolul apei în organism . . . . . 42
2.1.2. Apele meteorice . . . . . 43
2.1.3. Apele subterane . . . . . 43
2.1.4. Apele de suprafață . . . . . 44
2.1.5. Lacurile de acumulare . . . . . 46

2.2. Populația biologică a apei . . . . . 46
2.2.1. Microorganismele patogene transmisibile prin apă . . . . . 47
2.2.1.1. Virusuri . . . . . 47
2.2.1.2. Bacterii . . . . . 48
2.2.1.3. Fungi . . . . . 51
2.2.1.4. Protozoare . . . . . 51
2.2.1.5. Helminți . . . . . 52

2.3. Indicatori bacteriologici . . . . . 53
2.3.1. Numărul total de germeni . . . . . 54
2.3.2. Germenii coliformi . . . . . 55
2.3.3. Streptococii fecali (enterococii) . . . . . 55
2.3.4. Germenii anaerobi sulfito-reducători . . . . . 56
2.3.5. Bacteriofagii enterici . . . . . 58
2.3.6. Pseudomonas aeruginosa . . . . . 59
2.3.7. Norme sanitare . . . . . 60

2.4. Analiza microbiologică a apei . . . . . 63
2.4.1. Recoltarea, transportul și păstrarea probelor de apă . . . . . 63
2.4.2. Determinarea numărului total de bacterii aerobe (UFC) ce se dezvoltă la 22°C și 37°C . . . . . 65



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

2.4.3. Determinarea cantitativă a coliformilor totali și fecali . . . . 66
2.4.3.1. Metoda tuburilor multiple . . . . . 66
2.4.3.2. Metoda membranei filtrante . . . . . 74
2.4.3.3. Tehnici de teren rapide . . . . . 77
2.4.4. Determinarea cantitativă a streptococilor fecali . . . . . 80
2.4.5. Determinarea cantitativă a clostridiilor anaerobe sulfito-reducătoare și a speciei Clostridium perfringens în apă și nămol . . 85
2.4.6. Determinarea cantitativă a bacteriofagilor enterici din apă . . 92
2.4.7. Metoda decelării calitative și cantitative a speciei Pseudomonas aeruginosa din apele potabile, apele minerale și apele clorinate din piscine . . . . . 96
2.4.8. Decelarea prezenței genului Salmonella . . . . . 98
2.4.9. Decelarea genului Shigella . . . . . 103
2.4.10. Decelarea prezenței vibrionilor holerici de grup 0 : 1 și vibrionilor holerici de grup non 0 : 1 . . . . . 105
2.4.11. Decelarea prezenței speciei Yersinia enterocolitica . . . . . 108
2.4.12. Decelarea prezenței genului Camphylobacter . . . . . 111
2.4.13. Decelarea prezenței speciei Legionella pneumophila . . . . 113
2.4.14. Decelarea prezenței Leptospirelor . . . . . 116
2.4.15. Metode de investigare virusologică a apei . . . . . 118
2.4.15.1. Recoltarea probelor de apă pentru analiza virusologică . 119
2.4.15.2. Concentrarea virusurilor din probele de apă . . . 120
2.4.15.3. Izolarea, identificarea și determinarea cantitativă a virusurilor din probele concentrate . . . . . 124
2.4.16. Determinarea prezenței Candidei în apă . . . . . 126
2.4.17. Determinarea prezenței helminților din apă. Recoltarea probelor 129
2.4.18. Analiza biologică a apei . . . . . 130
2.4.18.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor de biologie 130
2.4.18.2. Apa de suprafață . . . . . 131
2.4.18.3. Apa potabilă . . . . . 136
2.4.18.4. Interpretarea rezultatelor determinărilor biologice . . 137

**3. Microbiologia solului.** (S. Mănescu, Pompilia Cernescu, Maria Șerbănescu, Lucia Lazăr) . . . . . 144
3.1. Introducere. Proprietățile fizice ale solului . . . . . 144
3.1.1. Permeabilitatea pentru aer . . . . . 144
3.1.2. Permeabilitatea pentru apă . . . . . 144
3.1.3. Selectivitatea . . . . . 145
3.1.4. Temperatura solului . . . . . 145
3.2. Flora microbiană telurică . . . . . 145
3.3. Poluarea microbiană a solului . . . . . 148
3.3.1. Contaminarea om-sol-om . . . . . 148
3.3.2. Contaminarea animal-sol-om . . . . . 149
3.3.3. Contaminarea sol-om . . . . . 149
3.3.4. Parazitozele transmise prin sol . . . . . 150
3.4. Poluarea chimică a solului . . . . . 151
3.5. Indicatori sanitari de poluare microbiologică . . . . . 152
3.5.1. Indicatorii direcți ai poluării biologice . . . . . 152
3.5.2. Indicatorii indirecți ai poluării biologice . . . . . 153
3.6. Analiza microbiologică a solului . . . . . 155
3.6.1. Recoltarea și prelucrarea probelor din sol . . . . . 155
3.6.1.1. Amplasarea punctelor de recoltare . . . . . 155
3.6.1.2. Recoltare, transport, păstrare . . . . . 156



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

3.6.1.3. Prelucrarea probei de sol . . . . . 156
3.6.1.4. Pregătirea diluțiilor . . . . . 157
3.6.1.5. Determinarea umidității solului . . . . . 157
3.6.2. Determinarea numărului de germeni din sol . . . . . 158
3.6.2.1. Determinarea germenilor mezofili . . . . . 158
3.6.2.2. Determinarea germenilor termofili . . . . . 159
3.6.2.3. Determinarea germenilor psihrofili . . . . . 159
3.6.2.4. Determinarea numărului de germeni sub formă de spori . . 159
3.6.3. Metode de determinare a germenilor indicatori de poluare fecală a solului . . . . . 159
3.6.3.1. Determinarea coliformilor totali . . . . . 159
3.6.3.2. Determinarea coliformilor fecali . . . . . 160
3.6.3.3. Determinarea streptococilor fecali (enterococi) . . . . 161
3.6.3.4. Determinarea germenilor sulfito-reducători . . . . . 161
3.6.3.5. Determinarea bacteriofagilor enterici . . . . . 162
3.6.4. Metode de determinare a germenilor patogeni din sol . . . . 163
3.6.5. Determinarea germenilor sporulați cu poartă de intrare cutanată . 165
3.6.5.1. Determinarea Clostridium tetani . . . . . 165
3.6.5.2. Determinarea bacilului antracis . . . . . 166
3.6.6. Determinarea prezenței genului Candida în sol . . . . . 166
3.6.7. Determinarea fungilor patogeni din sol . . . . . 168
3.6.7.1. Determinarea dermatofiților din sol . . . . . 168
3.6.8. Determinarea geohelminților din sol . . . . . 170
3.6.8.1. Metoda concentrării . . . . . 170
3.6.8.2. Metoda Kato și Miura . . . . . 171
3.6.8.3. Metoda Bailenger . . . . . 171
3.6.8.4. Metoda Willis-Hung . . . . . 171
3.6.9. Determinarea virusurilor din sol . . . . . 172
3.6.9.1. Recoltarea probelor . . . . . 172
3.6.9.2. Eluarea și concentrarea virusurilor . . . . . 172
3.6.9.3. Decontaminarea probelor . . . . . 174
3.6.9.4. Izolarea virusurilor din probe și identificarea lor . . . . 174

4. **Microbiologia alimentelor** (C. Nițulescu, Doina Oprișescu, Elena Vădineanu, Olga Zavate) . . . . . 178
4.1. Rolul și semnificația microorganismelor în alimente . . . . . 178
4.1.1. Microflora saprofită . . . . . 178
4.1.2. Microflora patogenă . . . . . 179
4.2. Microorganisme întîlnite în alimente . . . . . 180
4.2.1. Bacteriile din alimente . . . . . 180
4.2.2. Virusuri transmise prin alimente . . . . . 185
4.2.2.1. Unele grupe de virusuri animale, care pot fi transmise și prin alimente . . . . . 186
4.2.2.2. Virusurile direct patogene la om, vehiculate de alimente . 186
4.2.2.3. Virusuri în general nepatogene la om, transmise prin alimente 187
4.2.2.4. Stabilitatea virusurilor în alimente . . . . . 188
4.2.3. Fungii : drojdiile și mucegaiurile . . . . . 189
4.2.3.1. Levurile sau drojdiile . . . . . 189
4.2.3.2. Mucegaiurile . . . . . 190
4.2.4. Paraziți transmiși prin alimente . . . . . 192
4.3. Interrelații ecologice aliment-microorganisme . . . . . 194
4.3.1. Alterarea produselor alimentare : microflora dominantă în alterarea unor alimente . . . . . 198



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

4.3.2. Microflora dominantă în alterarea cărnii, preparatelor de carne, a păsărilor și a peștelui . . . . . 199
4.3.2.1. Alterarea cărnii . . . . . 200
4.3.2.2. Alterarea preparatelor de carne . . . . . 201
4.3.2.3. Alterarea cărnii de pasăre . . . . . 202
4.3.2.4. Alterarea peștelui . . . . . 202
4.3.3. Alterarea legumelor și fructelor . . . . . 202
4.3.4. Alterarea ouălor . . . . . 203
4.3.5. Alterarea laptelui și lactatelor . . . . . 204
4.3.6. Alterarea cerealelor . . . . . 205

4.4. Indicatori sanitari microbiologici pentru aprecierea produselor alimentare 206

4.4.1. Generalități. Controlul microbiologic al produselor alimentare . 206
4.4.2. Examenul cantitativ ca indicator microbiologic sanitar. Numărul total de microorganisme . . . . . 207

4.4.3. Bacterii folosite ca indicatorii de contaminare fecală a alimentelor 209
4.4.3.1. Bacteriile coliforme ca indicatori sanitari ai contaminării fecale a alimentelor . . . . . 210
4.4.3.2. Enterococii ca indicatori sanitari de contaminare fecală . 211
4.4.3.3. Bacteriile din genul Proteus ca indicatori sanitari . . 213
4.4.3.4. Clostridiile sulfito-reducătoare . . . . . 214

4.5. Analiza microbiologică a laptelui și derivatelor . . . . . 216

4.5.1. Recoltarea probelor . . . . . 216

4.5.2. Determinarea numărului total de germeni . . . . . 217

4.5.3. Numărul probabil de bacterii coliforme . . . . . 219

4.5.4. Număr probabil de Esch. coli fecali . . . . . 220

4.5.5. Germeni patogeni . . . . . 221
4.5.5.1. Determinarea germenilor din genul Salmonella . . . . . 221
4.5.5.2. Stafilococii coagulazo-pozitivi . . . . . 222
4.5.5.3. Bacillus cereus . . . . . 222
4.5.5.4. Bacterii sporulate anaerobe . . . . . 223
4.5.5.5. Determinarea numărului probabil de Clostridium perfringens 223
4.5.5.6. Determinarea germenilor din genul Mycobacterium . . . 224
4.5.5.7. Brucella . . . . . 225
4.5.5.8. Determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri . . . . 226

4.5.6. Alte examene complementare . . . . . 227
4.5.6.1. Identificarea laptelui mastitic . . . . . 227
4.5.6.2. Controlul eficienței pasteurizării . . . . . 227
4.5.6.3. Determinarea factorilor inhibitori din lapte . . . . . 228

4.6. Analiza microbiologică a cărnii și peștelui . . . . . 230

4.6.1. Recoltarea probelor . . . . . 230

4.6.2. Bacterioscopia . . . . . 231

4.6.3. Determinarea numărului total de germeni . . . . . 232

4.6.4. Determinarea bacteriilor coliforme . . . . . 232

4.6.5. Determinarea Escherichiei coli . . . . . 233

4.6.6. Determinarea germenilor din grupul Proteus . . . . . 233

4.6.7. Determinarea numărului de Bacillus cereus . . . . . 233

4.6.8. Determinarea Clostridiilor sulfito-reducătoare . . . . . 233

4.6.9. Determinarea germenilor patogeni . . . . . 234
4.6.9.1. Determinarea prezenței bacteriilor din genul Salmonella . 234
4.6.9.2. Determinarea numărului de stafilococi coagulazo-pozitivi . 235



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

4.6.10. Analiza microbiologică a cărnii conservate și a preparatelor din carne . . . . . 236
4.6.11. Determinarea germenilor patogeni . . . . . 236
4.6.12. Analiza parazitologică a cărnii și produselor din carne . . . 237
4.6.13. Analiza trichineloscopică . . . . . 237
4.6.13.1. Recoltarea probelor . . . . . 237
4.6.13.2. Pregătirea probelor . . . . . 238
4.6.13.3. Examinarea probelor . . . . . 238
4.6.14. Analiza microbiologică a saramurilor și soluțiilor . . . . 239
4.6.15. Analiza microbiologică a adjuvanților și condimentelor . . . 239
4.6.16. Condiții de calitate microbiologică . . . . . 240

4.7. Analiza microbiologică a conservelor . . . . . 242
4.7.1. Proba termostatării . . . . . 242
4.7.2. Recoltarea probei pentru analiză . . . . . 243
4.7.3. Analiza bacterioscopică . . . . . 243
4.7.4. Analiza prin culturi . . . . . 243

4.8. Analiza microbiologică a ouălor . . . . . 245
4.8.1. Ouăle proaspete . . . . . 245
4.8.2. Analiza microbiologică a prafului de ou . . . . . 246
4.8.3. Analiza microbiologică a maionezei . . . . . 246

4.9. Analiza microbiologică a băuturilor . . . . . 247
4.9.1. Băuturile nealcoolice . . . . . 247
4.9.2. Băuturile alcoolice . . . . . 248
4.9.2.1. Băuturi slab alcoolice (fermentabile) . . . . . 249
4.9.2.2. Băuturi tari spirtoase (distilate) . . . . . 249

4.10. Analiza microbiologică a zahărului și produselor zaharoase . . . 250
4.10.1. Examenul microbiologic al zahărului . . . . . 250
4.10.2. Analiza microbiologică a produselor zaharoase . . . . . 252
4.10.3. Produsele de coferărie și patiserie . . . . . 253
4.10.4. Mierea . . . . . 255
4.11. Analiza microbiologică a pîinii, făinii și cerealelor . . . . . 256
4.11.1. Examenul microbiologic al pîinii . . . . . 256
4.11.2. Examenul microbiologic al făinii . . . . . 256
4.11.3. Examenul microbiologic al cerealelor . . . . . 257

4.12. Analiza microbiologică a legumelor și fructelor . . . . . 257
4.12.1. Legume și fructe proaspete . . . . . 257
4.12.2. Legume uscate, deshidratate . . . . . 258
4.12.3. Examenul microbiologic al fructelor congelate . . . . . 258
4.12.4. Conservate prin acidifiere . . . . . 259
4.12.5. Tehnica examenului helmintologic al legumelor și fructelor . 260

4.13. Analiza virusologică a produselor alimentare . . . . . 261
4.13.1. Prelucrarea probelor de alimente . . . . . 261
4.13.1.1. Prelucrarea produselor alimentare lichide (lapte, derivate lactate, acidulate, sucuri) . . . . . 261
4.13.1.2. Prelucrarea produselor alimentare semisolide (brînzeturi, smîntînă semifabricate de carne și pește, pîine) . 262
4.13.1.3. Prelucrarea produselor alimentare solide (crupe, carne, unele brînzeturi etc.) . . . . . 262
4.13.1.4. Prelucrarea probelor de legume . . . . . 263
4.13.2. Concentrarea particulelor virale din produse alimentare . . . 263
4.13.2.1. Concentrare cu PEG . . . . . 263
4.13.2.2. Concentrare cu ajutorul filtrării . . . . . 263
4.13.2.3. Concentrare cu ajutorul sedimentării cu sulfat de aluminiu 264
4.13.3. Purificarea materialului de flora microbiană . . . . . 264



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

4.14. Analiza micologică a alimentelor . . . . . 265
4.14.1. Examen micologic cantitativ . . . . . 265
4.14.1.1. Recoltarea probei . . . . . 265
4.14.1.2. Pregătirea probei în vederea analizei micologice . . 266
4.14.1.3. Determinarea numărului de mucegaiuri (levuri) și drojdii 266
4.14.2. Examen micologic calitativ . . . . . 267
4.14.2.1. Identificarea morfologică a coloniilor de mucegaiuri . 267
4.14.2.2. Examinarea drojdiilor (levurilor) . . . . . 268
4.14.2.3. Metodă rapidă pentru selectarea tulpinilor prezumtiv alfatoxinogene de mucegaiuri . . . . . 268
4.14.2.4. Identificarea morfologică a coloniilor de mucegaiuri diagnostic de gen — prezentată în figuri . . . . . 269

**5. Microbiologia produselor farmaceutice și cosmetice** (E. Totescu) . . . 280
5.1. Microbiologia produselor farmaceutice . . . . . 280
5.1.1. Principalii germeni izolați din produsele farmaceutice . . . . 282
5.1.2. Originea contaminării produselor farmaceutice . . . . . 282
5.1.3. Norme pentru produsele farmaceutice . . . . . 283
5.1.4. Analiza microbiologică a produselor farmaceutice . . . . . 284
5.1.4.1. Precontrolul mediilor de cultură . . . . . 284
5.1.4.2. Determinarea activității bacteriostatice și fungistatice . 285
5.1.4.3. Număr de probe de prelevat . . . . . 286
5.1.4.4. Interpretarea rezultatelor este condiționată de recomandările farmacopeei naționale . . . . . 289
5.1.5. Controlul purității microbiologice . . . . . 290
5.1.5.1. Prelevarea probelor . . . . . 291
5.1.5.2. Determinarea numărului total unități formatoare de colonii (NTUFC) . . . . . 291
5.1.5.3. Determinarea numărului probabil de coliformi totali și Escherichia coli . . . . . 293
5.1.5.4. Determinarea germenului Staphylococcus aureus . . . 295
5.1.5.5. Determinarea germenilor Pseudomonas aeruginosa . . 295
5.1.5.6. Determinarea enterobacteriaceaelor (cu referire în special la Salmonella, Escherichia coli, Shigella) . . . . . 295
5.2. Microbiologia produselor cosmetice . . . . . 296
5.2.1. Recoltarea și pregătirea probelor . . . . . 297
5.2.2. Pregătirea produsului cosmetic în funcție de consistență și starea fizică . . . . . 297
5.2.3. Analiza microbiologică propriu-zisă . . . . . 298
5.2.3.1. Număr total unități formatoare de colonii (NTUFC) (germeni) 298
5.2.3.2. Număr total unități formatoare de colonii (NTUFC) (drojdii și mucegaiuri) . . . . . 298
5.2.3.3. Cercetarea spectrului microbiologic al produsului cosmetic 299
5.2.3.3.1. Tehnica de lucru pentru germeni aerobi . . . 299
5.2.3.3.2. Tehnica de lucru pentru germeni anaerobi . . 299
5.2.3.3.3. Considerații generale privind orientarea în diagnostic . . . . . 299
5.2.3.3.4. Cercetarea unor germeni de interes medical . . 300



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

**6. Controlul microbiologic în unităţile sanitare** (E. Cazacu) . . . . . 308

6.1. Introducere . . . . . 308

6.2. Controlul microbiologic al sterilizării . . . . . 310
6.2.1. Controlul sterilizării la autoclave cu abur sub presiune . . . 310
6.2.2. Controlul sterilizării cu aer cald . . . . . 312
6.2.3. Controlul sterilizării cu oxid de etilen, formol sau radiaţii ionizante 315

6.3. Controlul sterilităţii materialelor sanitare utilizate în tehnicile aseptice 316
6.3.1. Recoltarea probelor . . . . . 317
6.3.2. Incubarea şi citirea probelor . . . . . 318
6.3.3. Interpretarea rezultatelor . . . . . 319
6.3.4. Controlul microbiologic al sistemului de împachetare şi păstrare a materialelor sanitare sterile . . . . . 319
6.3.5. Indicaţii de control al sterilităţii . . . . . 319

6.4. Controlul microbiologic al eficienţei dezinfecţiei mîinilor . . . . . 320

6.5. Controlul microbiologic al personalului sanitar: examene profilactice şi examene de focar . . . . . 323

6.6. Controlul microbiologic al umidificatoarelor şi tubulaturii pentru administrarea oxigenului. Controlul microbiologic al respiratoarelor . . 325

**7. Medii de cultură** . . . . . 329

Scanned with OKEN Scanner

# Introducere

*Bacteriologia sanitară este acea parte a bacteriologiei care se ocupă cu contaminarea factorilor de mediu și rolul acestora în transmiterea unor boli infecțioase. Rolul acestor factori în producerea bolilor transmisibile a fost arătat de o serie de autori cu mult înainte de descoperirea agenților microbieni patogeni, încă din antichitate. Se cunosc astfel lucrările lui Hipocrat care afirma că factorii de mediu (aerul, apa, solul) joacă un rol deosebit de important în producerea unor boli molipsitoare. Mai mult chiar, în mod empiric, s-a stabilit că unii factori ca apa, dacă este tulbure sau mîloasă, nu este bună pentru a fi băută, deoarece favorizează diverse boli. Ulterior, odată cu descoperirea agenților infecțioși etiologici și cu posibilitatea determinării prezenței lor în factorii de mediu s-a confirmat rolul acestora în transmiterea diverselor afecțiuni, unele purtînd chiar denumirea generică a factorului incriminat: boli aerogene, boli hidrice, boli telurice sau alimentare.*

*Odată stabilit acest rol al diverșilor factori de mediu, s-a trecut la studiul posibilităților sau al mecanismelor de transmitere a diverselor boli infecțioase. Aceste studii au întregit cunoștințele despre rolul factorilor de mediu în producerea bolilor transmisibile, stabilindu-se necesitatea întrunirii a cel puțin trei condiții esențiale și anume: a) existența unui eliminator de germeni patogeni; b) prezența germenilor respectivi în factorul de mediu incriminat și c) prezența unei mase receptive față de afecțiunea pe care agentul patogen respectiv o poate declanșa (fig. 1). S-a ajuns astfel la constatarea că agenții patogeni nu pot supraviețui în factorii de mediu decît un timp limitat în funcție atît de specia microbiană respectivă, cît și condițiile pe care factorii de mediu le oferă. Acest fapt a condus către necesitatea de a se putea stabili în ce măsură și în ce condiții factorii de mediu își pot juca rolul de transmițători de boli. In plus, studiile efectuate au confirmat că factorii de mediu pot fi contaminați fără a fi purtători de germeni patogeni, dar apariția acestora poate deveni oricînd ca posibilă. De asemenea, s-a afirmat pe bună dreptate că prin factorii de mediu pot fi transmise și boli ai căror agenți nu pot fi încă determinați, dar care fac parte din aceleași grupe de boli ai căror agenți prezintă această posibilitate. In această situație a apărut o noțiune nouă, aceea a germenilor indicatori sau a acelor germeni care prin prezența lor pot indica că factorul studiat este contaminat și deci are posibilitatea de a deveni transmițător dacă apare și eliminatorul de germeni patogeni. Noțiunea de indicator a fost utilizată mai de mult timp în igienă și a fost preluată și de bacteriologia sanitară.*



Scanned with OKEN Scanner

*Acceptînd noțiunea de indicator al contaminării bacteriene a factorilor de mediu a apărut și necesitatea stabilirii momentului cînd un germen nepatogen sau condiționat patogen poate fi indicator. Dacă pentru germenii patogeni simpla lor prezență în factorii de mediu poate fi considerată ca suficientă pentru a considera factorul cercetat ca periculos — deși în realitate adevăratul pericol este reprezentat și de numărul germenilor patogeni prezenți — pentru germenii indicatori stabilirea*

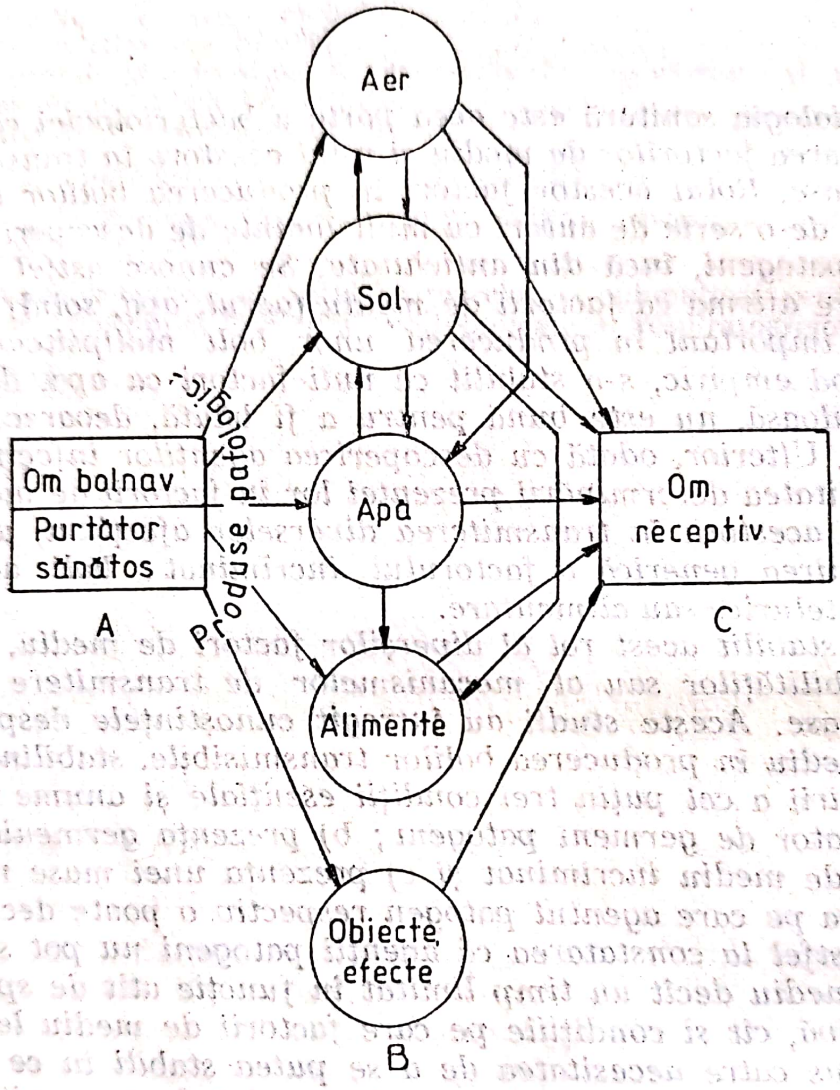



*Fig. 1*

*numărului prin examene bacteriologice cantitative și nu numai calitative —apare ca absolut necesară. Examenul bacteriologic cantitativ devine astfel obligatoriu în bacteriologia sanitară, fapt ce a dus la stabilirea de norme sanitare sau limite maxime admisibile pentru germenii indicatori prezenți în factorii de mediu. Aceste norme sanitare reprezentate la început ca recomandări și păstrate ca atare și astăzi pentru unii factori de mediu, ca solul spre exemplu, au devenit însă pentru alți factori ca apa și alimentele recunoscute ca obligatorii sub formă de standarde naționale sau internaționale. Acest nou aspect diferențiază bacteriologia sanitară de cea medicală, care se axează cu precădere pe germenii patogeni și de cele mai multe ori numai pe examenele bacteriologice calitative.*



Scanned with OKEN Scanner

*Sub acest aspect bacteriologia sanitară devine o armă deosebit de prețioasă în supravegherea condițiilor sanitare pe care trebuie să le respecte factorii de mediu și intră în controlul curent al acestor factori, utilizînd metode uzuale de investigare. Dar pentru ca rezultatele obținute prin aceste metode folosite în mod obișnuit să fie valabile și mai ales comparabile este necesar ca în determinarea germenilor indicatori să se folosească și tehnici standardizate ca mediile de cultură, cantitățile însămînțate, timpul și temperatura de incubare etc.*

*Desigur că această uniformizare devenită obligatorie pentru examenele bacteriologice curente în bacteriologia sanitară, atît ca tehnici, cît și ca interpretare, nu exclude, ci presupune și posibilitatea extinderii investigațiilor în condiții deosebite ca expertizele sanitare, anchetele epidemiologice, investigațiile complexe etc. În aceste condiții tehnicile microbiologice utilizate pot căpăta un caracter particular stabilit ad-hoc față de situația concretă respectivă și constă atît în investigații suplimentare, prin lărgirea gamei de studiu, cît și prin adîncirea investigației pentru a putea cunoaște mai bine fenomenul studiat. În plus, în cazul acestor investigări suplimentare interpretarea rezultatelor obținute nu se poate limita numai la compararea cu normele sanitare, ci trebuie ca această interpretare să se facă în contextul condițiilor sanitare în care s-a petrecut fenomenul cercetat.*

*Pentru toate aceste motive am considerat utilă apariția unei lucrări de microbiologie sanitară, utilizînd experiența cîștigată în acest domeniu în ultimii 40 de ani, în cadrul Institutelor de Igienă și Sănătate Publică și a Centrelor sanitare antiepidemice. Fiind prima lucrare de acest gen din țara noastră, poate prezenta inconsistențele inerente unei premiere, de aceea vom fi recunoscători tuturor acelora care consultînd-o și utilizînd-o, ne vor veni în ajutor cu părerile și observațiile domeniilor lor.*

Profesor doctor **SERGIU MĂNESCU**

Scanned with OKEN Scanner

# 1. Microbiologia aerului, obiectelor şi suprafeţelor

## 1.1. ORIGINEA MICROORGANISMELOR DIN AER

Atmosfera nu dispune de o floră proprie — în sensul existenței unor organisme a căror mediu specific de viață să fie aerul — dar conține în permanență microorganisme provenite de pe sol, din apă, vegetație sau organismele umane și animale. Densitatea acestor microorganisme variază în funcție de apropierea de sol, dar pot fi găsite și la mare înălțime, sau pe suprafețe întinse de apă la distanță de țărm. Încă vechile cercetări ale lui Proktor și Parker (1938) au arătat că pînă la peste 5 000 m se găsesc atît bacterii (Bacillus subtilis, Bacillus albolactis etc.), cît și fungi (Penicillium globrum, Penicillium lanosum). Mai recent, Green și colaboratorii (1964), au găsit îndeosebi fungi din genurile Alternaria, Aspergillus și Cladosporium pînă la 27 500 m, iar Zahell (1942) a pus în evidență pînă la 740 km de coastă deasupra mării, prezența bacteriilor și fungilor.

## 1.2. NATURA MICROORGANISMELOR DIN AER

Microorganismele din aer provin în cea mai mare parte din natură. La acestea se adaugă microorganismele provenite de la oameni și/sau animale. Frecvența și natura acestora depinde de locul unde le urmărim prezența. Astfel, în locurile slab populate, vor domina microorganismele provenite din natură, numărul lor fiind mai mare în apropierea solului, mai ales dacă este bogat în vegetație și mai mic la altitudine, în zonele de deșert și mai ales pe suprafețele mari de apă, la distanță de țărm.

Structura și densitatea florei microbiene din aer se schimbă în zonele în care există colectivități omenești organizate. Pe lîngă germenii din natură apar și germenii adaptați parazitismului uman și animal, densitatea lor în aer crescînd în funcție de densitatea populației din zona respectivă.

De asemenea, raportul dintre flora microbiană din natură și flora de origine umană se schimbă, aceasta din urmă devenind precumpănitoare în condiții de încăpere, îndeosebi cînd există aglomerație sau ventilație deficitară.



Scanned with OKEN Scanner

### 1.2.1. Clasificare și semnificație sanitară

Există deci în atmosferă aceste două grupe de microorganisme (floră din natură și floră de origine umană sau animală). Flora din natură joacă un rol deosebit de important într-o sumă de procese biologice (fermentații, biodegradare a unor substanțe etc.). Prezintă importanță pentru patologia umană, în special în măsura în care poate constitui alergene. Micozele umane cu fungii din natură sînt relativ rare.

Germenii de origină umană sau animală pot fi grupați în germeni saprofiți, condiționat patogeni și patogeni. Cei saprofiți nu joacă nici un rol în patologia infecțioasă, în timp ce germenii condiționat patogeni și îndeosebi cei patogeni pot provoca îmbolnăviri specifice. În acest caz aerul constituie calea de transmitere a acestor boli, boli care sînt extrem de frecvente în colectivitățile omenești.

Din acest motiv, din punct de vedere sanitar, prezintă interes deosebit studiul microorganismelor din aer, care sînt de origină umană sau animală.

## 1.3. ROLUL AERULUI ÎN RĂSPÎNDIREA BOLILOR INFECȚIOASE

### 1.3.1. Principalele boli aerogene

Aerul joacă un rol epidemiologic foarte important, constituind cale de transmisie pentru un număr mare de agenți patogeni. Bolile infecțioase care se transmit pe calea aerului se găsesc pe primul loc ca frecvență, cel puțin în zona temperată a globului terestru, iar ca număr reprezintă cca 20% din bolile infecțioase. Astfel, avem bolile infecțioase ale copilăriei (rujeola, rubeola, scarlatina, varicela, infecția urliană etc.), gripa și celelalte viroze respiratorii, pneumopatiile cu micoplasme, infecțiile respiratorii acute bacteriene, difteria, legioneloza, tuberculoza, pneumonia, orhitoza-psitacoza, diferite micoze respiratorii etc. Există și boli care pe lîngă alte căi de transmisie se pot răspîndi și pe cale aerogenă, cum ar fi poliomielita, tularemia sau mai rar, ciuma, cărbunele etc. De asemenea, flora patogenă sau condiționat patogenă din aer poate provoca infectarea plăgilor sau a arsurilor. De menționat și alveolitele alergice extrinsece provocate de fungi și actinomicete (plămînul fermierului, bagosopa etc.).

### 1.3.2. Comportarea în atmosferă a microorganismelor patogene

Supraviețuirea în aer a germenilor de origine umană sau animală, depinde de o serie de factori. În general, aerul nu oferă condiții de dezvoltare a microflorei de origină umană, supraviețuirea lor fiind limitată de existența unor condiții defavorabile. Astfel, temperatura aerului suferă



Scanned with OKEN Scanner

mari variații și numai întîmplător corespunde condițiilor optime pentru metabolismul florei mezofile (35—40°C) ; nici umiditatea aerului nu îndeplinește cerințele bacteriilor din acest grup, atît prin valoarea în general scăzută a umidității relative, cît și prin oscilațiile permanente pe care le prezintă. În aer lipsește orice suport nutritiv pentru microorganismele care parazitează organismele umane sau animale. La acești factori nefavorabili se adaugă existența unor agenți cu acțiune bactericidă sau bacteriostatică, dintre care cel mai important îl reprezintă radiațiile ultraviolete. În aceste împrejurări nu poate fi vorba de dezvoltarea acestor microorganisme, ci numai de un potențial mai mare sau mai mic de rezistență. Din acest punct de vedere, microorganismele se deosebesc foarte mult între ele, caracteristicile lor biologice determinînd capacitatea de supraviețuire în mediul extern. În linii generale, putem considera că sporii fungilor și bacteriile sporulate au rezistența cea mai mare, urmînd formele vegetative ale bacteriilor și virusurile. În special, la ultimele două grupe există mari diferențe de la specie la specie.

Germenii patogeni și condiționat patogeni, la rîndul lor, au comportament foarte diferit ; cei care au posibilitatea de a dezvolta forme de rezistență (spori) vor avea o supraviețuire îndelungată. Între germenii care au numai forme vegetative, pot fi unii cu rezistență relativ mare (în special dacă sînt feriți de radiațiile solare), cum ar fi bacilul tuberculozei, bacilul difteric, unii piococi etc., alții au rezistență mai mică (virusurile gripale și paragripale, pneumococul etc.), iar alții o rezistență foarte mică, de la cîteva minute la cel mult cîteva ore (de exemplu, virusul rujeolei). Ținînd seama de marea răspîndire a bolilor pe cale aeriană au existat și unele teorii care au susținut că, în condiții speciale se pot crea în atmosferă situații prielnice dezvoltării germenilor. O astfel de teorie a fost emisă de Trillat, care susținea că în spații limitate, în caz de saturație a aerului cu vapori de apă sau de ceață, anumite gaze ca $NH_3$ sau $CO_2$ se pot solvi în picături de ceață și da naștere la adevărate medii de cultură. Dacă acest lucru în condiții excepționale, este posibil pentru o floră autotrofă, pentru flora patogenă (heterotrofă), acest fenomen nu poate avea loc (Topley și Wilson). De fapt, Trillat și-a renegat ulterior propria teorie.

Deci, timpul în care un germen eliminat de bolnav sau purtător poate infecta un organism receptiv, deși variabil de la o specie microbiană la alta, este în orice caz limitat. De asemenea, trebuie ținut seama că în atmosferă numărul germenilor patogeni se reduce foarte repede, atît prin faptul că sînt repede distruși, cît și prin faptul că se diluează foarte mult. Din aceste motive, în atmosfera exterioară, unde factorii negativi au o acțiune mai pronunțată și unde diluția este mult mai mare, flora patogenă din aer joacă un rol mult mai redus decît în spațiile închise. Pornind de la faptul că în atmosferă au fost găsite pînă la înălțimi mari microorganisme care au fost ridicate de pe sol de curenții de aer, la acest nivel curenții orizontali putîndu-i transporta pînă la distanțe mari, s-a emis ipoteza că acest lucru ar fi posibil și cu flora patogenă, realizîndu-se astfel transmiterea la distanță a anumitor infecții. Teoretic, acest lucru nu ar fi posibil, decît cu germenii cu rezistență foarte mare (germenii sporulați, ca bacilul cărbunos), dar nici pentru această categorie de agenți patogeni, fenomenul nu a putut fi dovedit.



Scanned with OKEN Scanner

Astfel, microorganismele de origină umană sau animală din aerul exterior nu par a juca, după cunoștințele actuale, un rol important în patologia umană. Totuși, pe străzi aglomerate, prost curățate și intens circulate, prezența florei de origină umană sau animală este mai mare decît în parcuri sau zone curate. De asemenea, în apropierea stațiilor de tratare a apelor uzate se pot găsi microorganisme intestinale, inclusiv agenți patogeni. Însă, flora din aerul încăperilor și în general a spațiilor închise joacă rolul principal și bine demonstrat în transmiterea aerogenă a bolilor infecțioase, în special în condiții de aglomerație sau ventilație insuficientă.

Din acest motiv, aeromicroflora constituie o problemă sanitară mai importantă în locuințe, cămine, săli publice, cazărmi și în mod deosebit în instituții curativo-profilactice (spitale, policlinici) și instituții de copii (creșe, cămine, școli), unde transmiterea aeriană a infecțiilor se realizează cu mare ușurință (densitatea mare de persoane și un număr însemnat de purtători).

De asemenea, studiul aeromicroflorei este important pentru industria alimentară sau unitățile de alimentație publică și colectivă, putînd influența calitatea produsului alimentar sau să se producă chiar contaminarea alimentelor cu floră patogenă sau condiționat patogenă. Este, de asemenea, importantă problema aeromicroflorei în laboratoarele în care se lucrează cu material infecțios, posibilitățile de infecție fiind în aceste împrejurări maxime.

### 1.3.3. Proveniența germenilor patogeni din aer

Proveniența germenilor patogeni din aer este, în general, din căile respiratorii superioare, cavitatea bucală, de pe suprafața pielii (în special leziunile sau plăgile supurate) și din dejectele umane sau animale. Există și o anumită floră condiționat patogenă, cu un caracter mai ubicvitar în natură, în această categorie intrînd în primul rînd agenții unor parazitoze pulmonare (coccidoidomicoza, histoplasmoza, sporotrichoza, criptococcoza etc.), sau fungii și actinomicetele responsabile de alveolite alergice extrinseci. În condițiile de laborator, care folosește material infectat, microorganismele respective ajung în aer rezultînd din operațiile obișnuite : arderea ansei, pipetarea, inocularea de material infecțios la animale etc. ; se pare că însăși unele manevre, aparent fără pericol — cum ar fi scosul dopului de vată de la o eprubetă cu o cultură microbiană — se însoțesc de răspîndirea în aer a germenilor (Langmuir).

### 1.3.4. Forme de existență a germenilor patogeni din aer

Eliminați de diferite surse, germenii de origină umană sau animală nu se găsesc în aer sub formă de corpi microbieni izolați ci, în general, aderenți de un anumit substrat. Astfel, se consideră că ei sînt distribuiți în aer sub trei forme :

— picături de secreție nazală, buco-faringiană sau — eventual — bronșică, eliminate pe nas sau pe gură în timpul strănutului, tușitului, cîntului sau vorbitului (picături Flügge) ;

— nuclei de picătură care rezultă din evaporarea picăturilor mai mici de secreție nazală, buco-faringiană sau bronșică (drapplet nuclei Wells) ;

— atașați de particule de praf (praful contaminat sau pulberea bacteriforă).

### 1.3.4.1. Picăturile de secreție nazală, buco-faringiană sau bronșică

Acestea sînt picături care ajung în aer în momentul actelor obișnuite de strănut, tușit, cîntat sau vorbit. Cantitatea cea mai mare de picături se elimină la strănut ; tot prin strănut, picăturile sînt proiectate la distanța cea mai mare. Numărul picăturilor și distanța la care sînt proiectate este mai mică în timpul tușitului, fiind cea mai mică în timpul vorbitului. S-a observat la vorbit că pronunțarea anumitor consoane, ca : p, b, t, k, s, dă naștere în primul rînd la eliminarea picăturilor. De fapt, aceste mecansime sînt esențiale în răspîndirea în aer a germenilor patogeni, Flügge (1899) fiind primul care a susținut că picăturile de secreții nazofaringiene, bronșice sau salivare, eliminate de bolnav sau purtător, duc la răspîndirea bolilor infecțioase (din acest motiv aceste picături și poartă numele picături Flügge). Observația lui Flügge s-a referit în special la transmiterea tuberculozei, acest cercetător susținînd că picăturile inhalate sau contactul cu obiectele contaminate de ele reprezintă modul principal de transmitere al tuberculozei. Ulterior, acest punct de vedere a fost extins și la celelalte boli a căror poartă de intrare este aparatul respirator și ai căror agenți patogeni se elimină pe cale respiratorie (rujeolă, scarlatina, gripa, difteria, poliomielita etc.)

Flügge și cei care i-au continuat investigațiile ulterior, s-au referit exclusiv la particulele de secreție propriu-zise, așa cum se elimină din gură sau nas. În special, s-au referit la particulele de dimensiuni mari (mai mari de 100 μm). Aceste particule, datorită dimensiunilor lor, sedimentează foarte rapid după eliminare și se depun în general la 1,5—2 m (cel mult 2,5 m) de cel care le elimină. În acest fel ar fi suficient să recomandăm o distanță de 2,5 m de bolnav, pentru a obține protecție față de îmbolnăvire. S-a observat uterior că particulele eliminate pot avea dimensiuni mai mici, iar stabilitatea lor în atmosferă să fie mai mare. Astfel, Lascencov, folosind o suspensie de Chromobacterium prodigiosum, cu care a badijonat faringele, a arătat că distanțele pînă la care se răspîndesc germenii sînt variabile după modul de eliminare, la distanță mai mică în timpul vorbitului, mai mare în timpul tușitului și cea mai mare după strănut. În acest fel, cei 1,5—2,5 m pot fi mult depășiți.

### 1.3.4.2. Nucleii de picătură

Deși din experiențele lui Lascenkov, distanța la care se face răspîndirea s-a dovedit a fi mai mare, totuși stabilitatea în atmosferă a acestor picături este foarte mică, datorită dimensiunilor lor și a sedimentării.



Scanned with OKEN Scanner

S-a observat însă că, o dată cu picăturile mari, se elimină și un număr de picături foarte mici. Astfel, la un strănut s-a calculat că se elimină aproximativ 20 000 de particule, diametrul lor variind de la aproximativ 10 μm pînă la dimensiuni de peste 1 mm. Particulele de dimensiuni mari vor fi proiectate pînă la o anumită distanță, însă vor sedimenta foarte repede, cele de dimensiuni mici vor sedimenta mult mai încet, însă vor fi proiectate la o distanță mult mai mică (datorită energiei lor cinetice foarte mici, rezultată din masa lor, redusă). Wells, (1934), a calculat timpul în care aceste picături cad la o distanță de 2 m datorită forței de gravitație și în funcție de dimensiuni. Astfel, a stabilit că particulele cu un diametru de 100 μm parcurg acești 2 m în 6 secunde, cele de 10 μm în 10 minute, iar cele de 1 μm în 16,6 ore. Dar în timpul trecerii lor prin aer, dacă atmosfera nu este saturată în vapori de apă se vor evapora, pierzînd apa în funcție de dimensiunea lor, într-un timp mai lung sau mai scurt (tabel nr. I).

*Tabel nr. I*

**Timpul de evaporare a picăturilor de apă în atmosfera liniștită, nesaturată în vapori de apă la temperatura de 22°**
**(după Topley și Wilson)**

| *Diametrul particulelor în μm* | *Timpul de evaporare în secunde* |
|---|---|
| 2 000 | 515,0 |
| 1 000 | 129,0 |
| 500 | 32,0 |
| 200 | 5,2 |
| 100 | 1,3 |
| 50 | 0,3 |
| 25 | 0,08 |
| 12 | 0,02 |

După cum rezultă din tabel, picăturile mici de apă se evaporă foarte repede, mare parte dintre ele evaporîndu-se înainte de a ajunge să sedimenteze. Picăturile eliminate de om nu au o comportare similară apei; acești aerosoli fiziologici, avînd o anumită structură — apă, mucus, mucoproteine, germeni (Recimenski), se evaporă mult mai lent. Totuși se poate considera că se păstrează aceeași relație între dimensiune și viteza de evaporare. Astfel, se consideră că particulele mai mari de 100 μm își păstrează forma de picătură un anumit timp, suficient de lung pentru a sedimenta practic nemodificate. În mod obișnuit nu depășesc distanța de 1,5—2,5 m de bolnavul sau purtătorul care le elimină. Doar în cazul strănutului, cînd viteza de eliminare poate atinge circa 40 m/sec. (Jenninson, Harch), ele pot să ajungă la distanțe mai mari, fapt demonstrat și de Lascenkov. Particulele de dimensiuni mai mici au o stabilitate mai mare în aer și există posibilitatea ca, înainte de a sedimenta, să piardă complet apa și să rămînă un rest de substanță organică și eventual germenul respectiv. În acest mod, dimensiunea scade și mai mult, iar stabilitatea în atmosferă crește. Aceste formațiuni își pierd structura de picătură și devin după denumirea propusă de Wells (1934), „nuclei de

picătură". După anumite calcule, acești nuclei de picături ar sedimenta în atmosfera complet liniștită cu o viteză de 30—60 cm/oră, însă, cum în încăperi există permanent curenți de aer, stabilitatea lor devine și mai mare, putînd rămîne în atmosferă ore întregi și să fie transportanți de curenții de aer dintr-o încăpere în alta, sau chiar de la un etaj la altul. Datorită nucleilor de picături, distanța de răspîndire pe calea aerului a infecțiilor respiratorii crește foarte mult.

Puterea infectantă a picăturilor Flügge este mult mai mare decît a nucleilor de picături, deoarece practic toate picăturile sînt contaminate cu microbi din gură și căile respiratorii, în timp ce dintre nucleii de picături numai un număr de circa 50% s-a calculat a conține germeni (Duguid). Chiar cînd provin de la bolnavi sau purtători, numai o parte din picăturile sau nucleii de picături conțin și germeni patogeni. Cercetări făcute la purtători de streptococ hemolitic au arătat că dintre picăturile eliminate numai 10% conțineau acest germen.

### 1.3.4.3. **Praful contaminat (pulberea bacteriferă)**

Praful contaminat (pulberea bacteriferă) este constituit din particule de praf pe care se găsesc adsorbite microorganisme. Acești germeni pot să provină din picăturile sau nucleii de picături depuși pe sol sau pe podeaua încăperii, din puroiul plăgilor supurate, din expectorații sau secrețiile nazofaringiene uscate și din dejecte. Particulele de praf de dimensiuni mari se depun rapid, cele de dimensiuni mai mici rămîn un timp mai îndelungat în suspensie în aer. Praful depus pe podeaua unei încăperi poate fi din nou adus în suspensie în timpul măturatului sau datorită curenților de aer. Un număr mare de particule de praf contaminat poate ajunge în aer în momentul scuturării covoarelor, a rufăriei de pat sau a celei de corp. În special, în condiții de spital, momentul în care se face curățenia încăperii sau scuturarea rufăriei de pat (schimbarea lenjeriei de pat etc.), este una din împrejurările în care în aer se găsește cel mai mare număr de germeni. Prin intermediul prafului bacterian se vor transmite în special acele afecțiuni a căror agenți patogeni au o rezistență mai mare în mediul extern.

Astfel, de exemplu, în transmiterea tuberculozei, Cornet (1889) a susținut că principalul mod de infectare se realizează prin intermediul prafului rezultat din sputa uscată. Deși această veche teorie a fost mult combătută și s-a demonstrat transmiterea tuberculozei poate mai frecvent pe alte căi, (picături de secreție etc.), totuși există și această cale posibilă. Bacilii Koch vii au putut fi puși în evidență destul de frecvent în praful din sanatoriile de tuberculoză. De asemenea, a fost demonstrată prezența bacililor difterici în praful de pe podeaua din jurul bolnavilor de difterie. Și unii streptococi patogeni sau condiționat patogeni au fost izolați din praful camerelor în care se găseau purtătorii. O problemă importantă o ridică astăzi și prezența altor germeni patogeni (stafilococi, Pseudomonas etc.), care de asemenea, au fost găsiți pe rufărie și obiecte venite în contact cu purtătorii. În condiții favorabile s-a observat că toate aceste organisme mai rezistente în mediul extern pot rămîne în



Scanned with OKEN Scanner

viață, virulente, timp de cîteva săptămîni. De asemenea, în special, în aerul din spațiile libere se pot găsi germeni sporulați sau spori de ciuperci, aderenți de particule de praf.

În acest mod, praful bacterian poate contribui în măsură importantă la răspîndirea unor infecții cu piococi, a scarlatinei, difteriei, tuberculozei, pneumomicozelor etc. și mai ales la infectarea plăgilor și arsurilor. Există și posibilitatea ca unele viroze ai căror agenți patogeni sînt mai rezistenți în mediul extern să fie transmise și prin intermediul prafului bacterian.

## 1.4. MECANISMUL DE INFECTARE A ORGANISMULUI CU FLORA PATOGENĂ DIN AER

Ținînd seama de faptul că transmiterea unei boli infecțioase prin intermediul picăturilor de secreție presupune un timp foarte scurt de trecere a germenilor prin aer, datorită sedimentării rapide a particulelor, mulți autori încadrează acest mod de transmitere în categoria contaminărilor prin contact, recunoscînd drept boli aerogene (care au aerul drept cale de transmitere) numai pe cele transmise prin nuclei de picături sau praf bacterian. Își susțin acest punct de vedere și prin faptul că măsurile de profilaxie sînt diferite. În cazul transmiterii prin picături, măsurile principale sînt de izolare a bolnavului, igienă individuală strictă și educația sanitară ; în cazul transmiterii prin praf bacterian sau nuclei de picături, esențiale sînt măsurile de dezinfecție, curățenie și cele tehnico-sanitare. Deși există aceste deosebiri între modul de transmitere prin picături și cele prin nuclei de picături, cele două categorii nu pot fi totuși considerate separat, avînd în vedere modul lor identic de formare, cum și faptul că cunosc tot aerul drept cale de transmitere, chiar dacă există diferențe în ceea ce privește timpul cît durează trecerea prin mediul aerian.

Indiferent de formele sub care se găsesc în aer, germenii patogeni pot provoca îmbolnăvirea organismelor expuse în primul rînd prin inhalarea suspensiilor contaminate (picături, nuclei de picături, praf), provocînd boli ale aparatului respirator sau uneori boli infecțioase, care cunosc drept poartă de intrare aparatul respirator. De asemenea, prin depunerea lor pe plăgi pot provoca infectarea acestora. În special, în sălile de operații existența unei încărcări mari bacteriene a aerului poate reprezenta un factor important în apariția supurației în plăgile operatorii. Contaminarea obiectelor, alimentelor sau mîinilor poate favoriza ingestia microorganismelor patogene din aer.

În ceea ce privește pătrunderea germenilor din aer în aparatul respirator, trebuie să considerăm flora din aer ca fiind prezentă sub formă de aerosoli. După cum se cunoaște, aparatul respirator are o mare capacitate de filtrare, protejînd cu ajutorul mecanismelor de reținere existente în căile respiratorii, țesutul pulmonar și alveola pulmonară, de eventuali agenți agresivi care se găsesc în suspensie în aer. Astfel, în bronșiola respiratorie nu pătrund decît particule în suspensii mai mici de 5 μm, iar în alveolă sub 3 μm. Cum această dimensiune este foarte apropiată de

cea a germenilor, alveola și țesutul pulmonar sînt foarte bine protejate de agresiunea microbiană. În acest fel, privind posibilitatea de infectare a aparatului respirator avem două categorii de germeni : o primă categorie este formată din germeni a căror putere de agresiune se exercită asupra nazofaringelui (streptococi hemolitici, bacil difteric etc.), sau asupra traheei și bronhiilor mari (H. pertusis) ; a două categorie cuprinde germenii care, în mod obișnuit, își exercită acțiunea patogenă în special la nivelul bronhiilor terminale sau a alveolei pulmonare (de exemplu, bacilul tuberculozei). În cazul primei categorii, puterea de filtrare a aparatului respirator este foarte mică, putînd fi infectate particule oricît de mari. Pentru a doua categorie, dimpotrivă, puterea de filtrare este foarte mare. Dimensiunea de 5 μm, apropiată cum am văzut de cea a corpilor microbieni, este excepțional întîlnită în condiții naturale între particulele infectante din aer. În mod obișnuit, germenii nu se găsesc în aer sub formă de corpi microbieni izolați, ci aderenți de un anumit substrat (picături, nuclei de picături, praf), care de obicei depășesc aceste dimensiuni. Experiențe făcute cu picături conținînd bacilii tuberculozei au arătat că, cu cît dispersia particulelor este mai mică (dimensiunea mai mare), cu atît numărul de animale care făceau boala, dintre cele expuse, era și cel mai mic. Cercetări extrem de minuțioase (Lurie și colab.), au arătat pe animale de laborator că un singur bacil al tuberculozei într-o particulă de dimensiuni sub 5 μm este capabil să producă leziune tuberculoasă caracteristică. Pentru această categorie de infecții, nucleii de picături prin dimensiunile lor mici, sînt cei mai agresivi.

O situație oarecum particulară o prezintă ciupercile, care pot provoca pneumomicoze. Găsindu-se în natură, ele pot da naștere la spori, a căror dimensiune este destul de mică, pentru a putea provoca o infestare în profunzimea aparatului respirator. Sporii ciupercilor care provoacă aceste micoze (coccidoidomicoza, histoplasmoza etc.), pot să se găsească și liberi în atmosferă, neaderenți de nici un substrat.

## 1.5. INDICAȚII DE APLICARE A CONTROLULUI MICROBIOLOGIC AL AERULUI ȘI NORME

Analiza bacteriologică a aerului nu se practică decît în mod excepțional, în scop de diagnostic epidemiologic (respectiv punerea în evidență a agentului patogen în aer în caz de epidemii), deoarece nu prezintă semnificație deosebită. Aplicația practică a acestei analize este de ordin sanitar, permițînd caracterizarea din punct de vedere igienic a potențialului pe care îl are ambianța de a permite transmiterea aerogenă a infecțiilor. Cum densitatea germenilor de proveniență umană sau animală este foarte redusă în atmosfera exterioară, metoda își are domeniul de aplicație în special pentru aprecierea condițiilor sanitare din încăperi și îndeosebi instituții sanitare, instituții de copii, unități de alimentație, industrie alimentară, industrie farmaceutică și săli publice.

Deoarece se urmărește stabilirea potențialului de transmitere aerogenă a germenilor patogeni și condiționat patogeni, analiza bacteriologică a aerului nu urmărește punerea în evidență a unui anumit microorganism



Scanned with OKEN Scanner

patogen, ci măsura în care aerul este încărcat cu microfloră de origină umană sau animală. Se recurge în felul acesta la anumiți indicatori bacteriologici de contaminare a aerului.

### 1.5.1. Indicatorii bacteriologici de contaminare a aerului

#### 1.5.1.1. Numărul total de germeni din aer care se dezvoltă la 37°C (flora mezofilă din aer)

Semnificația acestui indicator constă în faptul că ne permite a aprecia măsura în care aerul este încărcat cu flora de origină umană sau animală, deoarece la temperatura de incubare de 37° se dezvoltă cu precădere această floră. Indicația, deși foarte globală, permite a face aprecieri asupra condițiilor sanitare dintr-o încăpere (aglomerare, ventilație, stare de curățenie), care influențează transmiterea infecțiilor pe calea aerului. Prezintă dezavantajul că temperatura de 37° nu selecționează numai flora mezofilă, existînd în număr suficient de mare de germeni psihrofili care se pot dezvolta la această temperatură. Prin simplitatea determinării, rămîne indicatorul cel mai curent utilizat.

#### 1.5.1.2. Streptococii hemolitici (β hemolitici) și viridans (α hemolitici)

Acest grup de germeni este indicator de contaminare a aerului cu floră nazofaringiană și bucală. Semnificația prezenței acestor germeni în aer este dată de faptul că majoritatea infecțiilor aerogene sînt provocate de agenți patogeni care se elimină prin picături de secreție nazofaringiană, salivară și bronșică. Cum streptococii viridans se găsesc la majoritatea persoanelor în faringe și cavitatea bucală și excepțional altundeva în organism, (cu excepția tulpinilor α hemolitice de enterococi, care ajung puțin în aer), constituie indicatori fideli de contaminare a aerului pe această cale. Streptococii hemolitici (β hemolitici) se găsesc mai puțin frecvent în faringele oamenilor sănătoși, fiind agenți patogeni. În cazul cînd se găsesc în aer au semnificație sanitară și epidemiologică, și semnalizează prezența unui bolnav sau purtător de germeni.

#### 1.5.1.3. Stafilococii

Acești germeni sînt prezenți atît în căile respiratorii superioare, cît și pe suprafața cutanată a omului. Majoritatea tulpinilor sînt nepatogene, o parte sînt condiționat patogene și foarte puține sînt patogene. Rezistența lor în aer fiind relativ mare, contaminează constant mediul de viață al omului. Semnificația este apropiată de cea care o au microorganismele mezofile, indicînd însă mai precis originea umană sau animală a contaminării aerului.



Scanned with OKEN Scanner

Se pot determina toți stafilococii sau numai tulpini care au unul sau două caractere de patogenitate, în special formarea de pigment auriu sau/și hemolizină.

### 1.5.1.4. Germenii din grupul coliform

Prezența în aer a germenilor din grupul coliform traduce un grad ridicat de insalubrizare a mediului. Acest indicator bacteriologic este mai puțin folosit. Se pretează însă atît pentru aprecierea salubrității locuinței, cît și pentru caracterizarea condițiilor sanitare din spitale, în special din spitalele de pediatrie.

### 1.5.1.5. Norme sanitare

Pentru conținutul bacterian al aerului nu există pînă în prezent standarde. S-au făcut însă pe baza unor cercetări norme indicative, cu ajutorul cărora să se poată aprecia gradul de contaminare a aerului. Cele mai multe se referă la numărul total de germeni și mai puțin la streptococii hemolitici sau la stafilococi.

#### NUMĂRUL TOTAL DE GERMENI CARE SE DEZVOLTĂ LA 37°

I. A. Safir, propune pentru locuință, valori care sînt redate în tabelul nr. II.

*Tabel nr. II*

**Norme privind conținutul microbian al aerului din locuințe (după I. A. Safir)**
(număr de germeni la 37°/m³)

| | *vara* | *iarna* |
|---|---|---|
| curat | 1 500 | 4 500 |
| impurificat | 2 500 | 7 000 |

În aceste norme există cuprinsă o zonă incertă de curățenie relativă. De asemenea, diferențele mari dintre vară și iarnă, legate de ventilația mai redusă, nu sînt întrutotul justificate.

Pentru încăperile unde cercetarea aeromicroflorei este îndeosebi indicată se folosesc în special, valorile propuse pentru sezonul de vară. Orientativ, în locuințe și săli publice, microorganismele mezofile nu trebuie să depășească 2 500/m³.

În instituții de copii se consideră o contaminare acceptabilă a aerului la valoarea de 1 500 germeni la 37°/m³, maximum 2 000/m³. Pentru



Scanned with OKEN Scanner

sălile de operație, Bourdillon și Colebrook, propun următoarele valori maxime :

— săli de operație pentru intervenții mici
700 germeni/37°/m³
— săli de operație pentru intervenții mari, aseptice
350 germeni/37°/m³
— săli de operație de neurochirurgie, transplante, arsuri
3,5—70 germeni/37°/m³

În țara noastră, se recomandă în spitale ca, după curățenia cu dezinfecție, microorganismele mezofile din aer să nu depășească următoarele valori :

— săli de operație : 300/m³
— săli speciale (săli de pansamente, terapie intensivă, săli de pregătire a soluțiilor perfuzabile, saloane de copii prematuri, săli de nașteri, bucătării dietetice, biberonerie) : 500/m³
— saloane de bolnavi și alte încăperi : 600/m³

Flora hemolitică de orice natură trebuie să fie absentă în sălile de spital.

În sălile de operație în care se practică transplant de organe, sistemul de ventilație cu aer dezinfectat introdus de preferință în sistem laminar, trebuie să asigure sub 40 mezofili/m³, chiar sub 10/m³.

Și în încăperile în care sînt îngrijiți bolnavi aflați în deficit imunitar (imunosupresie terapeutică sau patologică), nivelul de încărcare a aerului trebuie să fie cît mai redus (de preferință sub 40 mezofili/m³).

În industria alimentară se recomandă ca mezofilii să nu depășească 600/m³, iar numărul de fungi 300/m³.

## STREPTOCOCII VIRIDANS ȘI β HEMOLITICI

I. A. Safir, propune normele care sînt redate în tabelul nr. III pentru locuințe.

**Norme de conținut al aerului în streptococi viridans și hemolitici (număr/m³)** (după I. A. Safir)

*Tabel nr. III*

| | *vara* | *iarna* |
|---|---|---|
| curat | 16 | 36 |
| impurificat | 36 | 124 |

## STAFILOCOCII

Fără a exista norme propuse, determinarea numărului de stafilococi a intrat în practica curentă. Se consideră că, cu cît proporția lor este mai mare, cu atît este mai certă contaminarea de origină umană. Acest fapt crește ca semnificație dacă se iau în considerare îndeosebi stafilococii aurii sau/și hemolitici.



Scanned with OKEN Scanner

Prezența germenilor din grupul coliformi indică un grad ridicat de insalubrizare a mediului, prezența lor în aer fiind contraindicată.

## 1.6. CONTAMINAREA OBIECTELOR ȘI A SUPRAFEȚEI CUTANATE

### 1.6.1. Contaminarea obiectelor cu agenți patogeni

Această contaminare poate reprezenta o cale de transmitere a infecțiilor microbiene, virotice sau parazitare. Supraestimată în perioada de debut a microbiologiei, rolul care i se atribuie acestei căi de transmitere este destul de modest în raport cu altele, fără însă a fi de neglijat în totalitate. Semnificația mai redusă rezultă din faptul că producerea infecției la persoanele receptive, depinde și de cantitatea de microorganisme pătrunse în organism ; este necesară fie o contaminare masivă a obiectului incriminat, fie contaminarea cu microorganisme extrem de agresive, fie — în sfîrșit — de transmiterea agentului patogen la o persoană foarte receptivă sau de inoculare a agentului patogen prin plăgi provocate de obiectele contaminate. Infectarea omului se face direct sau indirect. Calea directă presupune inocularea prin piele sau mucoase sau integrarea agenților patogeni prin introducerea obiectului contaminat în gură, sau prin intermediul mîinilor cu care acesta a venit în contact. Calea indirectă este dată mai ales de contaminarea alimentelor prin intermediul vaselor de bucătărie, contaminare care prin înmulțirea microorganismelor în alimente constituie cauza unor toxiinfecții alimentare. Aerul poate fi, de asemenea, contaminat, mai ales de pe îmbrăcăminte, covoare sau lenjerie de pat, pătrunderea microorganismelor realizîndu-se în acest caz pe cale inhalatorie.

Contaminarea cu agenți patogeni proveniți de la bolnavi sau purtători sănătoși se realizează cu floră provenită din nazofaringe, cavitate bucală și/sau secreție bronșică infectată, de pe suprafața cutanată și din tubul digestiv. Supraviețuirea microorganismelor patogene depinde de rezistența acestora în mediul exterior, de natura obiectului și de condițiile ambientale. În ceea ce privește rezistența naturală în mediul extern și pe obiecte, vor supraviețui mai mult sporii de fungi, levurile, chiștii de protozoare parazite și bacteriile sporulate — supraviețuire ce poate să se întindă pe ani de zile. Unele bacterii rezistă mai multe luni — ca bacilul Koch sau bacilul difteric — altele mai multe săptămîni (Salmonella, stafilococi), zile (streptococi, vibrion holeric), sau numai ore (pneumococ). Virusurile care se pot transmite prin intermediul obiectelor sînt în general acele care au rezistență mai mare în mediul extern, cu precădere enterovirusurile.

Condițiile ambientale care favorizează supraviețuirea microorganismelor sînt în special reprezentate de absența luminii, mai ales a radiației solare directe, umiditatea crescută și temperatura joasă.



Scanned with OKEN Scanner

În sfîrșit, în ceea ce privește perioada de supraviețuire a microorganismelor patogene, decisivă este și natura obiectelor contaminate, chiar dacă este cunoscut faptul că pe obiectele de metal microorganismele patogene rezistă timp mai scurt decît pe cele confecționate din alte materiale, că pe cele netede rezistența este, de asemenea, mai mică decît pe cele rugoase sau poroase în care sînt ferite de lumină și uscăciune și că, în fine, pe cele curate supraviețuirea este mai scurtă decît pe cele murdare, totuși datele foarte disparate existente permit greu o clasificare.

Prezentăm cîteva exemple privitoare la unele obiecte de uz foarte larg. În ceea ce privește hîrtia, pe cea de calitate mai slabă și poroasă, supraviețuirea este mai îndelungată. Astfel, pe hîrtie de ziar, Staphylococcus typhi trăiește pînă la 30 de zile, pentru ca pe hîrtia sugativă să poată fi găsit pînă la 84 zile. Stafilococul auriu trăiește pe hîrtia obișnuită de scris pînă la 90 zile, bacilul difteric 38 zile, iar vibrionul holeric 5—14 zile. Studii efectuate pe cărți de bibliotecă au arătat persistența bacilului Koch pînă la 135 zile, a bacilului difteric pînă la 28 zile, a Escherichia coli pînă la 180 zile și a stafilococului auriu pînă la 31 zile. Rezultatele înregistrate, atît în studii experimentale, cît și în condiții naturale, au subliniat dependența viabilității de condițiile de iluminat, umiditate și temperatură. Cu toată persistența îndelungată pe hîrtie, atît a microflorei respiratorii, cît și a celei cutanate și digestive, rolul cărților, ziarelor și scrisorilor în transmiterea bolilor infecțioase rămîne minor, justificîndu-se dezinfecția sau distrugerea acestora prin ardere doar în condițiile utilizării lor de către o persoană bolnavă de boală contagioasă. Un aspect particular îl prezintă bancnotele, datorită circulației lor foarte mari. Confecționate de obicei din hîrtie de calitate bună, permit o supraviețuire mai redusă a agenților patogeni, decît pe hîrtia din cărți și ziare, fapt la care contribuie expunerea la condiții de mediu diferite. Viabilitatea microorganismelor crește pe bancnotele uzate sau murdare. Deși supraviețuirea microorganismelor este mai scurtă decît pe alte obiecte de hîrtie, este suficient de lungă pentru a justifica evitarea folosirii acestora de către persoanele bolnave de boli infecțioase acute. Pe monedele metalice microorganismele patogene trăiesc relativ puțin, cel mult cîteva ore pînă la cîteva zile, chiar pentru cele mai rezistente în mediul exterior, cu excepția bacteriilor sporulate, a sporilor de ciuperci, a chiștilor de protozoare și a bacilului Koch.

Țesăturile pot juca un rol mai important în transmiterea infecțiilor, prin faptul că se contaminează ușor (îmbrăcămintea, lenjeria de pat, covoare etc.) și pot păstra timp destul de lung viabili agenții patogeni. Țesăturile cu cît sînt mai groase și pufoase, cu atîta reține în proporție mai mare microorganismele. De asemenea, agenții patogeni pot ajunge ușor să infecteze persoane receptive, fie prin contact direct, fie prin desprinderea prafului de pe țesături și contaminarea aerului. Studii efectuate pe cazarmament de spital sau militar au arătat supraviețuirea Salmonellelor pînă la 90 zile, a stafilococilor aurii 50 zile, a bacilului difteric 25 zile. Sporii de ciuperci, bacteriile sporulate și bacilul Koch supraviețuiesc luni de zile. Controlul contaminării țesăturilor mai ales în condiții de spital, unități de alimentație publică și colectivă, precum și în indus-



Scanned with OKEN Scanner

tria alimentară și aplicarea măsurilor corecte de dezinfecție și curățenie sînt perfect justificate.

Jucăriile au fost incriminate și ele în transmiterea bolilor infecțioase, fapt demonstrat de numeroase exemple din istoria epidemiologiei. Supraviețuirea microorganismelor patogene este cea mai ridicată la jucăriile confecționate din țesături, urmează cele din material plastic, cele din lemn și în sfîrșit, cele din metal. Astfel, stafilococul auriu rezistă pe metal 12 zile, pe cauciuc și lemn 14 zile, pe celuloid 65 zile, iar pe țesături de bumbac 72 zile. În unitățile de copii preșcolari, precum și în spitalele de pediatrie nu ar trebui să fie folosite jucăriile confecționate din țesături, iar celelalte să fie curățate și/sau dezinfectate corespunzător.

În ceea ce privește materialele de construcții, viabilitatea cea mai mică o au microorganismele patogene pe metal, urmează lemnul, fără mare deosebire între lemnul lustruit și lăcuit și cel fără aceste prelucrări, dar cu unele deosebiri de la o esență la alta, și materialele plastice. Pe materialele netede (sticlă, faianță, linolemn), viabilitatea este mai scăzută decît pe cele rugoase. Cleiul folosit pentru zugrăvirea cu humă a pereților favorizează supraviețuirea mai îndelungată a bacteriilor, virusurilor și fungilor, pentru unii dintre ultimii permițînd chiar înmulțirea.

Controlul sistematic al contaminării obiectelor se practică în unități spitalicești, în unități de alimentație și instituții de copii. De asemenea, se recomandă a se practica periodic și în industria farmaceutică, în unități de cazare colectivă și în unele unități de folosință publică (frizerii, băi publice etc.).

În analiza microbiologică se recurge îndeosebi la urmărirea indicatorilor de salubritate (floră mezofilă, streptococi $\alpha$ și $\beta$ hemolitici, stafilococi) și mai puțin — cu indicații precise epidemiologice — a microorganismelor patogene.

### 1.6.2. Contaminarea suprafeței cutanate

Această contaminare este de asemenea, cunoscută a contribui la transmiterea bolilor infecțioase și parazitare. Îndeosebi pentru bolile infecțioase a căror agenți patogeni se elimină pe cale digestivă, mîinile murdare sînt reputate a fi printre principalele căi de transmitere. Pe lîngă acestea, bolile infecțioase și parazitare cutanate cunosc de asemenea, o răspîndire largă. De pe suprafața cutanată pot fi contaminate și alimente, apă — în special apa de îmbăiere — îmbrăcăminte, lenjerie de pat, obiecte de uz curent, instrumentar medical etc.

Cercetările privind flora microbiană de pe suprafața cutanată au urmărit scopuri atît teoretice, cît și practice. Din punct de vedere teoretic interesează cantitatea și calitatea florei microbiene cutanate, distribuția germenilor pe suprafața pielii, precum și puterea de autopurificare a pielii. Din punct de vedere al distribuției microorganismelor pe suprafața pielii, punctul de vedere exprimat de Price în 1938 este și astăzi valabil. Autorul citat distinge două categorii de microorganisme ale pielii. O categorie este reprezentată de cei care sînt depuși pe suprafața pielii, atașați de impurități și fixați de secreția seboree. Acești germeni, denumiți de



Scanned with OKEN Scanner

Price, germeni „pasageri" (transients), sînt rezultatul murdăririi suprafeței cutanate, se îndepărtează relativ ușor prin spălare cu apă și săpun și sînt principalii agenți patogeni transmiși prin mîna murdară. Cea de a doua categorie de microorganisme — denumiți germeni „rezidenți" (residents) — se găsesc în straturile mai profunde ale epidermului și formează o populație de microorganisme relativ stabilă la același individ, fiind însă relativ variabilă de la un individ la altul. Atît cantitatea, cît și speciile care formează această populație pare a fi rezultatul unui echilibru între gazdă și parazit, echilibru condiționat de o parte de puterea autosterilizantă a pielii, la rîndul ei dependentă de vîrstă, echilibru hormonal, climat, alimentație etc. — și pe de altă parte de capacitatea de adaptare în piele a microorganismului respectiv. Din punct de vedere epidemiologic această categorie de microorganisme, o găsim la purtătorii cutanați de agenți patogeni.

Din punct de vedere al capacității de autopurificare a pielii s-a constatat că, după contaminarea experimentală, streptococi patogeni dispar după o zi, stafilococul auriu după 3 zile, iar Escherichia coli și Pseudomonas aeruginosa după o zi de pe piele uscată și după 3 zile de pe piele umedă. Puterea autosterilizantă a fost legată de acțiunea acizilor grași liberi — în special acid oleic — care se găsesc pe suprafața cutanată.

Din punct de vedere practic, variația cantitativă și calitativă a florei cutanate a fost urmărită pentru caracterizarea condițiilor sanitare și epidemiologice. Astfel, numărul de microorganisme mezofile de pe suprafața cutanată reprezintă un indice important al stării de curățenie a pielii. Controlul curățeniei pielii este important de efectuat la personalul din unitățile spitalicești pentru prevenirea infecțiilor nazocomiale, în unitățile de alimentație și industrie alimentară pentru prevenirea toxiinfecțiilor alimentare, în instituțiile de copii, în unele unități de interes public (frizerii, coafură, cosmetică) și în industria de medicamente.

De asemenea, urmărirea florei cutanate se mai practică pentru controlul puterii dezinfectante a unor substanțe folosite ca antiseptice cutanate, precum și pentru controlul celor mai bune tehnici de spălare, pentru unele categorii profesionale — în special chirurgi.

Pentru analiza bacteriologică efectuată cu scopul evaluării gradului de curățenie, se recurge, de asemenea, la folosirea indicatorilor de salubritate (numărul total de germeni mezofili, streptococi hemolitici, stafilococi, coliformi). Analiza poate urmări și identificarea de purtători sănătoși, în special pentru stafilococi patogeni și Pseudomonas aeruginosa.

## 1.7. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI

### 1.7.1. Metode de recoltare și însămînțare

Prin recoltarea probelor de aer pentru determinarea numărului de germeni se urmărește aprecierea germenilor viabili vehiculați pe calea aerului. Acești germeni rareori se găsesc sub formă de corpi microbieni singulari, întrucît ei ajung în aer fixați pe particule din stratul care îi conține, (stropi de secreție, scaune, fibre vegetale, praf) ; astfel, numărul



Scanned with OKEN Scanner

de germeni obținut prin oricare metodă de determinare reprezintă în realitate numărul de particule ce conțin germeni viabili, fiecare particulă putînd să conțină mai mulți germeni. De asemenea, trebuie avut în vedere că mediul de cultură folosit și temperatura de 37°C nu întotdeauna permit dezvoltarea tuturor germenilor prezenți în aer, de aceea rezultatele obținute vor reprezenta de cele mai multe ori o subestimare a numărului real de germeni pe unitatea de volum de aer.

La alegerea metodelor de recoltare a germenilor din aer trebuie să se țină seama de trei considerente :

1) metoda să fie eficientă în recoltarea particulelor între 1 și 10 μm ;
2) să permită evaluarea numărului de germeni la 1 $m^3$ aer ;
3) să permită identificarea anumitor germeni sau grupe de germeni.

În ceea ce privește însămînțarea, aceasta se poate realiza, fie direct pe medii solide turnate în cutii Petri, fie prin intermediul unui lichid steril (ser fiziologic, bulion steril) în care se concentrează germeni din aer și se însămînțează ulterior tot în suprafață pe medii solide.

### 1.7.1.1. Metoda de recoltare prin sedimentare (Koch)

Metoda constă în deschiderea și expunerea de cutii Petri cu un mediu solid, timp de cîteva minute pînă la 1 oră. Pentru a se putea calcula numărul de germeni la un anumit volum de aer, se recomandă expunerea timp de 5 minute sau expuneri de timp multiplu de 5 minute (10, 15, 20 minute etc. pînă la 1 h). După expunere, cutiile se închid și se incubează 24 h la 37°C, apoi se mai lasă încă 24 h la temperatura camerei și la lumină pentru a se permite dezvoltarea pigmentului la anumite specii bacteriene. Se numără apoi coloniile, plecînd de la premiza că fiecare colonie s-a dezvoltat dintr-un microorganism, abstracție făcînd de faptul că în același loc pe mediu a sedimentat o particulă cu mai mulți germeni. Numărînd toate coloniile, obținem numărul total de germeni (NTG), dar pentru aprecierea mai exactă a gradului de salubritate se recomandă extragerea din numărul total, a numărului de germeni indicatori specifici : Streptococi, Stafilococi, Coliformi, Klebsiele.

Timpul de expunere trebuie apreciat în funcție de gradul de încărcare a aerului. Trebuie evitată o încărcare prea mare cu colonii a suprafeței mediului de cultură, deoarece numărătoarea devine dificilă și există posibilitatea ca anumite bacterii prin aglomerare să inhibe dezvoltarea altora. Nici existența unui număr prea mic nu este de dorit, deoarece în acest caz apare o eroare sistematică mare.

Metoda prezintă avantajul că este simplă și permite efectuarea concomitentă a mai multor determinări, realizînd în acest fel o caracterizare destul de fidelă a gradului de contaminare a aerului. Metoda prezintă însă și unele dezavantaje : astfel, microorganismele care sedimentează sînt cele aderente pe suspensii de dimensiuni mai mari. Metoda va pune în evidență deci, în special bacteriile din picăturile lui Flügge și praful bacterian și în măsură mai mică cele din nucleii de picături. Astfel, nu obținem prin această metodă numărul real de microorganisme din aer, ci doar fracțiunea sedimentată în porțiunea de timp. De asemenea, metoda nu are pînă



Scanned with OKEN Scanner

în prezent un mod unitar de exprimare a rezultatului ; numărul de germeni se poate exprima prin raportare la timp și suprafață.

Pentru exprimare pe unitatea de volum de aer se poate folosi formula de calcul Omeliansky, care este bazată pe observația că în timp de 5 minute se depun pe o suprafață de 100 $cm^2$ germenii din 10 l de aer.

Formula de calcul este :

$$\text{Număr germeni/m}^3 \text{ aer} = \frac{n \times 10.000}{S \times \frac{T}{5}}$$

în care :

n = număr de colonii dezvoltate pe suprafața mediului de cultură

S = suprafața cutiei Petri (în $cm^2$)

T = timpul de expunere (în minute)

Această formulă se aplică frecvent în practică, deși rezultatele obținute au un oarecare coeficient de eroare.

### 1.7.1.2. **Metodele de recoltare prin aspirație**

Au avantajul că se poate exprima corect numărul de germeni la un volum determinat de aer ($m^3$). În cazul folosirii acestor metode este necesar un sistem de aspirație, un aparat de investigare a volumului de aer și un dispozitiv de reținere a microorganismelor. După sistemul de reținere a acestora se disting metode de filtrare, barbotare, impact și electroprecipitare.

1.7.1.2.1. *Metodele de filtrare.* Aerul aspirat este trecut prin mase filtrante care pot fi constituite din nisip de cuarț steril sau zaharuri (zaharoză, lactoză). Pentru aspirație se folosește o pompă aspiratoare, un debitmetru, iar masa filtrantă este conținută într-un filtru de sticlă (filtrul Petri) (fig. 2). În cazul masei filtrante din nisip de cuarț, acesta se spală după reținerea microorganismelor în ser fiziologic steril și suspensia bacteriană astfel obținută, se însămînțează în diluții, pe medii solide.

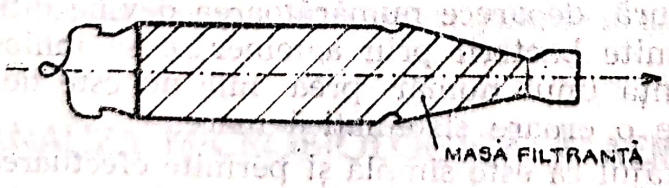



*Fig. 2* — Filtru Petri

Masa filtrantă din zaharuri se dizolvă într-un lichid steril și se însămînțează, de asemenea, în diluții pe medii sterile. Dezavantajul acestor metode este că sînt laborioase și implică și un coeficient de eroare mare la calcul, din cauza diluțiilor. Ca filtru de reținere a microorganismelor se mai pot folosi membrane filtrante (filtre miliporice), care, după însămînțare se depun pe suprafața unui mediu solid ce se incubează 24 ore la 37°C. Se numără coloniile de germeni ce se dezvoltă pe suprafața mem-



Scanned with OKEN Scanner

branei și se raportează la $m^3$ de aer, avînd în vedere numărul de metrii cubi de aer ce au fost filtrați.

1.7.1.2.2. *Metodele de barbotare.* Aerul aspirat este trecut prin vase barbotoare simple sau de tip impinger care conțin ser fiziologic steril și care reține microorganismele. Suspensia obținută se însămînțează în diluții pe medii solide. În cazul folosirii impingerului se pot obține valori mai ridicate din cauza desfacerii suspensiilor ce conțin mai mulți germeni. (fig. 3).

1.7.1.2.3. *Metodele de impact.* Cele mai folosite metode din acest grup sînt cele care realizează proiectarea aerului aspirat pe suprafața unui mediu de cultură solid, favorizînd aderarea particulelor cu germeni. Metodele de impact folosesc aparate construite special și în care impactul se realizează, fie datorită unui curent turbionar (centrifuga de aer Wells) fie prin trecerea aerului printr-o fantă îngustă (impactorul în trepte Andersen, aparatul Krotov, aparatul Ardelean), (fig. 4).

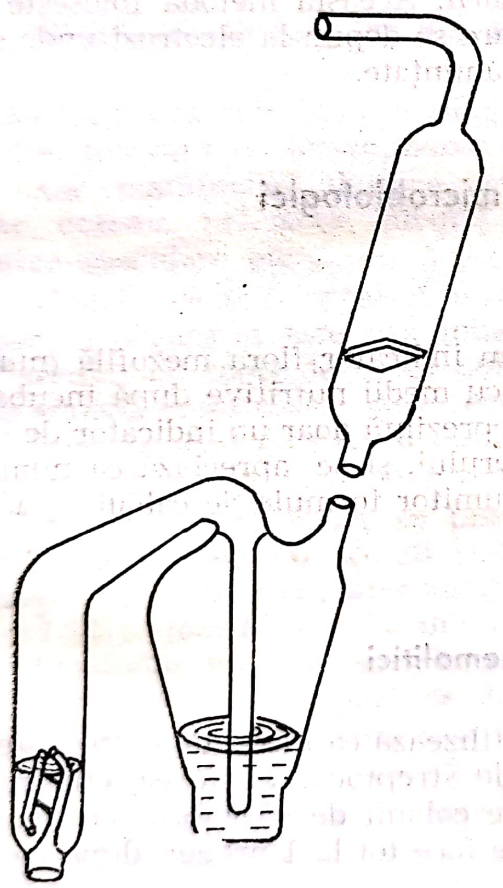


*Fig. 3* — Dispozitiv de barbotare

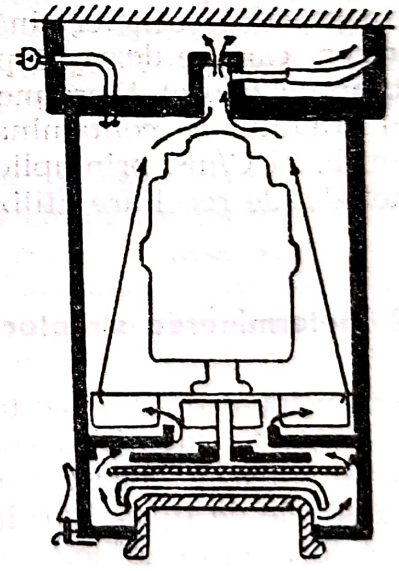


*Fig. 4* — Aparat Krotov

Aparatul Krotov mai frecvent folosit în țara noastră, este format dintr-un aspirator de aer acționat electric, un rotametru pentru înregistrarea debitului de aer aspirat și un suport pentru cutia Petri cu mediu de cultură, montat pe un ax ce imprimă suportului o mișcare de rotație. În capacul aparatului există o fantă îngustă de mărime aproximativ egală



Scanned with OKEN Scanner

cu raza cutiei Petri, prin care trece curentul de aer, în timpul funcționării aparatului. Notînd debitul cu care a funcționat aparatul în momentul recoltării, precum și timpul afectat însămînțării plăcii, se poate calcula prin numărarea coloniilor crescute pe placă după incubare 24 ore la 37°C, numărul de microorganisme/$m^3$ aer.

Formula de calcul este următoarea :

$$\frac{n \times 1000}{V} = \text{număr microorganisme pe } m^3$$

în care :

n = număr colonii dezvoltate pe placă

V = volume de aer aspirat

Aparatul prezintă avantajul că are eficiență mare, permițînd practic stabilirea densității reale a microorganismelor din aer. Dezavantajul este că nu permite efectuarea concomitentă a unui număr mare de însămînțări și cere existența unei surse de curent electric în apropierea punctului de recoltare.

1.7.1.2.4. *Metoda electroprecipitării.* Această metodă folosește principiul ionizării particulelor din aer care se depun la electrozi unde se găsesc mediile solide care sînt astfel însămînțate.

## 1.7.2. Determinarea indicatorilor microbiologici

### 1.7.2.1. Determinarea florei mezofile

În practică se determină ca prim indicator flora mezofilă (numărul de germeni care se dezvoltă pe plăci cu medii nutritive după incubare la 37°C timp de 24 ore). Flora mezofilă reprezintă doar un indicator de orientare al gradului de contaminare a aerului, și se apreciază ca număr de germeni la 37°C/$m^3$, prin aplicarea anumitor formule de calcul caracteristice metodei de recoltare utilizată.

### 1.7.2.2. Determinarea streptococilor hemolitici

Pentru identificarea acestora se utilizează ca medii de cultură geloză-sînge 5—7%. Se identifică coloniile de streptococ după aspectul morfologic și se notează separat numărul de colonii de streptococ cu hemoliză de tip α și cele de tip β. Exprimarea se face tot la 1 $m^3$ aer, după modelul de calcul al florei mezofile.

### 1.7.2.3. Determinarea stafilococilor

Pentru a putea utiliza acest indicator este de preferat ca și în cazul streptococilor, folosirea mediului geloză-sînge. Luînd în considerare aspectul morfologic al coloniilor, se numără toate coloniile considerate a



Scanned with OKEN Scanner

fi de stafilococ. Folosirea mediului geloză-sînge ne permite să apreciem și hemoliza produsă în jurul coloniilor și să obținem o informație suplimentară în ceea ce privește caracterul de patogenitate. Exprimarea rezultatului în număr total de stafilococi sau stafilococi hemolitici se face cu ajutorul aceloraşi formule de calcul folosite în cazul florei mezofile.

### 1.7.2.4. **Determinarea coliformilor**

Pentru aprecierea existenței coliformilor în aer, se recomandă izolarea de pe mediul geloză-sînge a coloniilor presupuse a fi enterobacterii după aspectul coloniilor. Confirmarea se face prin trecerea pe medii diferențiale (Levine). Nu se recomandă recoltarea directă pe medii diferențiale, deoarece acestea inhibă dezvoltarea coliformilor recoltați dintr-un mediu puțin favorabil cum este aerul.

### 1.7.2.5. **Determinarea fungilor din aer**

Semnificația patologică a fungilor se lărgește pe zi ce trece, ei intervenind frecvent în determinarea stărilor de sensibilizare și în declanșarea unor manifestări alergice locale sau generale, cum sînt astmul bronșic, eczema, urticarea, edemul anginoneurotic, reacțiile alergice-hiperergice vasculare etc.

Avînd în vedere faptul că una din căile frecvente de pătrundere a fungilor în organism este cea inhalatorie, determinările privind încărcarea aerului cu spori de fungi pot aduce unele date ce intervin în patologia umană respiratorie, care recunoaște ca agenți patogeni, atît fungii ce se găsesc în mod normal în orofaringe și tractul respirator, cît și fungii exogeni ce provin din mediul ambiant.

Determinări de fungi se practică atît în aerul atmosferic, cît și în aerul încăperilor, cu scopul stabilirii gradului de încărcare cu spori de fungi a acestuia prin investigații cantitative și calitative.

1.7.2.5.1. *Recoltarea sporilor de fungi din aerul atmosferic* sau din aerul diferitelor încăperi se poate face în mod pasiv, prin expunerea unor suprafețe pe care sporii se depun datorită gravitației sau a curenților de aer, sau prin metode active, în care aerul este aspirat, iar sporii sînt colectați prin diferite procedee.

1.7.2.5.2. *Metoda sedimentării* pentru determinarea încărcării fungice a aerului atmosferic. Se expun lame de sticlă unse cu soluție glicerinată Erdtman sau Calberia, cu suprafața gresată în sus, pe suporturi neacoperite, dacă se folosesc în încăperi sau, în cazul utilizării în aer liber, sub adăposturi, pentru a le feri de precipitații. După o expunere de 24 ore, lamele se examinează la miscroscop.

Pentru numărarea sporilor de ciuperci depuși în timpul expunerii, lama înainte de a fi examinată la microscop se acoperă cu un strat de ulei de cedru și cu cîte o lamelă degresată. Pentru ușurarea numărătorii



Scanned with OKEN Scanner

peste lamela obișnuită se așează o lamelă cu laturile de 1 cm, delimitînd suprafața de 1 $cm^2$.

Sporii de ciuperci apar colorați în galben sau brun spre deosebire de grăunciorii de polen care sînt colorați în roșu datorită fucsinei.

Se numără sporii în diferite cîmpuri, se face media numărului de spori pe un cîmp și se raportează la întreaga suprafață a lamei și la timpul de expunere.

Dacă se urmărește încărcarea fungică a aerului atmosferic pe o perioadă lungă — sezon sau an —, rezultatele se înscriu zilnic sau la 48 h pe un grafic, împreună cu datele meteorologice privind temperatura medie, precipitațiile, viteza și direcția curenților de aer, presiunea atmosferică etc.

Cînd determinările se efectuează în mai multe puncte simultan și se dorește a prezenta în grafic dinamica mediei densității sporilor dintr-o zonă limitată, trebuie aplicate teste de semnificație statistică :

$$\text{Valoarea medie} \quad M = \frac{\Sigma \cdot X}{N}$$

X = valoarea fiecărei probe în parte
N = numărul total al probelor
Σ = suma valorilor

Pentru fiecare valoare se calculează abaterea medie.

1.7.2.5.3. *Metoda Koch* — adaptată pentru determinări ale numărului total de fungi/$m^3$ aer. Metoda a fost descrisă anterior și este folosită pentru determinări de fungi din aerul atmosferic, dar în mod special pentru determinări în aerul diferitelor încăperi.

Se folosesc medii de cultură solide cu adaos de antibiotice, cele mai întrebuințate fiind mediile Sabouraud sau Czapek.

În calcul se folosește formula Omelianski și exprimarea rezultatelor se face în număr de fungi/$m^3$ de aer.

Norme orientative pentru încărcarea fungică a aerului din încăperi :

| | | | |
|---|---|---|---|
| valori normale | — pînă la | 550 | colonii/$m^3$ aer |
| infestare medie | — între | 550—700 | colonii/$m^3$ aer |
| infestare maximă | — peste | 700 | colonii/$m^3$ aer |

1.7.2.5.4. *Metoda aspirației.* Se efectuează prin trecerea unui volum cunoscut de aer printr-un filtru Pasteur, sau prin filtrare de membrană, fie prin dirijarea volumului de aer cercetat asupra unei suprafețe adezive pe care aderă sporii de ciuperci, fie utilizînd aparatura necesară analizei aerului, bazate pe principiul electrostatic.

1.7.2.5.5. *Identificarea sporilor de fungi.* Pentru identificarea sporilor de fungi din aer, paralel cu lamele utilizate pentru recoltarea prin sedimentare sau prin aspirație, se expun în aceleași puncte de priză și la aceleași înălțimi, cutii Petri cu mediu solid Sadouraud sau Czapek cu antibiotic. Expunerea se face între 15 și 30 minute. Pentru determinări în aerul atmosferic se preferă perioada dintre orele 12—16. După expunere, plăcile se etanșeizează cu leucoplast și se incubează 24 h la 37°C sau se țin la temperatura camerei 6—7 zile.



Scanned with OKEN Scanner

Coloniile dezvoltate se examinează macroscopic și microscopic.

Examenul macroscopic, se face cu ochiul liber, lupa de mînă sau lupa binocular și se observă caracterele superficiale ca : formă, culoare, tipul de fructificație etc.

### 1.7.2.6. Determinarea genului Candida din aer

Recoltarea sporilor de Candida din aer se face prin metoda Koch, folosind ca mediu de cultură, mediul Sabouraud sau P.C.B. cu antibiotic. După expunere plăcile se incubează la 37°C, timp de 24, 48, 72 ore, urmărind după fiecare interval în parte, apariția coloniilor cu următoarele caractere :

— colonii cremoase alb-cenușii de diferite dimensiuni cu marginea neregulată, cu centrul ridicat și prelungire radiare sau colonii rotunjite, plate, albe, cu constituție cărnoasă.

Din coloniile suspecte a fi din genul Candida se face un preparat între lamă și lamelă și se examinează la microscop.

Pentru identificarea certă a diferitelor specii de Candida, metoda cea mai sigură o constituie cercetarea activității de fermentație a zaharurilor (zigograma), sau a activității de asimilare a zaharurilor, respectiv a compușilor azotați (axograma).

## 1.8. DETERMINAREA VIRUSURILOR DIN AER

Cercetarea aerului atmosferic se efectuează la indicații epidemiologice pe locurile de irigații prin stropire a apelor reziduale în cazul cînd apar îmbolnăvirile la muncitori sau populație, locuind în zona de influență a instalațiilor de stropire. Mai poate fi cercetat, aerul încăperilor din colectivități de copii, spitale etc., de asemenea la indicații epidemiologice.

### 1.8.1. Recoltarea probelor de aer

Probele de aer atmosferic se recoltează la distanța de 100 m, 500 m și 1 000 m de la sursa de dispersare a apei cu ajutorul unor aspiratoare recoltoare de aerosoli, de diferite tipuri (exemplu, PAB-1 în U.R.S.S.). Principiul de funcționare a acestor aparate se bazează pe faptul că particulele suspendate în aer în trecerea prin aparat se încarcă cu sarcină negativă și se sedimentează apoi de un electrod încărcat pozitiv plasat pe fundul unui recipient în care se toarnă un lichid de captare. Debitul aparatului este de 125—150 litri de aer pe minut.

Aparatul este instalat în punctul de recoltare și în recipientul de sedimentare se toarnă precaut lichidul (bulion peptonat sau hidrolizat de lactalbumină) în cantitate de 25—30 ml. Recoltarea probei durează



Scanned with OKEN Scanner

7—8 minute, se recoltează 1—2 $m^3$ de aer. După terminarea lucrului se deconectează aspiratorul, se scoate fundul și lichidul este trecut într-un flacon steril.

Probele de aer din încăperi se recoltează în trei puncte din încăpere cu ajutorul aparatelor POV-1 sau PAB-1 (U.R.S.S.). Dispozitivul de aspirație se fixează la o înălțime de 1—1,5 m de la dușumea. Ca lichid de captare în aparat se folosește un amestec de mediu 199 și soluție de dextran 6% (poliglutina) în proporție de 2 : 1. Se cercetează cîte 0,5—1,0 $m^3$ de aer. Probele recoltate într-o încăpere se amestecă într-un singur volum (proba medie).

### 1.8.2. Prelucrarea probelor de aer. Concentrarea cu ajutorul polietilenglicolului (PEG)

În eprubete cu lichid de captare se adaugă 1 picătură de 5 M soluție NaCl și 3—4 ml de soluție PEG 30% cu pondere moleculară 4 000 sau 6 000 pînă la opacifierea suspensiei. Suspensia obținută este agitată puternic manual și se centrifughează la 1 500 t/min timp de 20—30 minute. În eprubetă se formează două straturi lichide despărțite printr-un inel limitrof transparent. Stratul superior al lichidului se culege atent cu pipeta și se îndepărtează rămînînd, totuși, deasupra inelului o coloană de 1—2 ml. Restul materialului se purifică și se păstrează la temperatura de —20°C pînă la punerea în lucru.

Purificarea materialului de flora bacteriană și de proteină poate să se efectueze prin una din următoarele două metode :

— *Cu ajutorul freonului 113 :* la 15 ml freon 113 (1,1,2,-triclortrifluoretan) se adaugă 63 ml n-heptan ajustînd astfel greutatea specifică a freonului la 1,36 ; se amestecă o parte din materialul de purificat cu 3 părți de freon cu pondere specifică de 1,36 ; se agită proba energic manual, sau la agitator timp de 5 minute ; se aspiră faza lichidă atent cu o pipetă, se trece în tub de centrifugă, se centrifughează la 5 000 t/min timp de 20 minute ; partea supernatantă a centrifugatului se trece într-un flacon steril și se astupă cu un dop de cauciuc.

— *Cu ajutorul eterului etilic :* la lichidul în prelucrare se adaugă un volum egal de eter etilic ; se amestecă bine lichidul cu eter folosind jetul subțire și puternic realizat prin pipetarea lichidului cu o pipetă de 5 ml cu pară de cauciuc ; după ce s-a format o suspensie omogenă, lichidul se lasă în repaus la temperatura de +4°C pentru o noapte ; a doua zi, dopurile de cauciuc se înlocuiesc cu altele de tifon, lichidul se centrifughează la 3 500 t/min timp de 20 minute ; se formează două straturi de lichid și la limita dintre ele un inel de substanță grăsoasă ; trecînd cu vîrful pipetei prin acest inel se aspiră cu atenție lichidul de pe fund și se trece în plăci Petri ; plăcile rămîn parțial deschise (de preferat în nișă) și din timp în timp clătinate ; peste 1—2 ore, cînd eterul s-a evaporat, ceea ce se simte prin absența mirosului caracteristic al eterului, lichidul este trecut în flacoane sterile ; în cazul unei impurificări masive cu floră microbiană a materialului de cercetat, procedeul

de purificare se repetă de 2 ori sau după primul ciclu de purificare se introduc în materialul de cercetat antibiotice în proporție de 1 000 unități de penicilină, 1 000 mg de streptomicină la 1,0 ml lichid.

Lichidul obținut se inoculează pe gazde de laborator (culturi celulare și animale) în cadrul laboratoarelor de virusologie specializate. Pînă la punerea în lucru se stochează la —20°C.

## 1.9. METODE DE DETERMINARE A CONTAMINĂRII OBIECTELOR ȘI SUPRAFEȚEI CUTANATE

Aceste metode urmăresc desprinderea germenilor de pe suprafața cercetată și trecerea lor pe suprafața unor medii de cultură solide. După incubare se numără coloniile dezvoltate și se raportează la unitatea de suprafață. În acest scop la recoltare se delimitează și se calculează suprafața investigată. Pentru unele obiecte mai mici sau pentru mîini se poate raporta rezultatul la întreaga suprafață.

### 1.9.1. Recoltarea și însămînțarea germenilor

Pentru recoltarea și însămînțarea probelor de pe suprafețe există o serie de metode, în practica curentă folosindu-se însă cele mai ușor de efectuat. Aceste metode permit determinarea numărului total de germeni, precum și unele specii considerate ca indicatori (streptococi, stafilococi, coliformi). O critică se poate aduce acestor metode, și anume că nici una nu conferă certitudinea recoltării tuturor germenilor de pe o suprafață, ele conferindu-ne numai posibilitatea de a estima în general starea sanitară a suprafeței cercetate și riscul transmiterii unor infecții de contact.

#### 1.9.1.1. Metoda tamponului

Se folosesc tampoane sterile de vată sau tifon montate pe o tijă de lemn și introduse în eprubetă cu 10 cc. ser fiziologic (similare ecuvioanelor folosite pentru recoltarea exsudatului faringian).

Suprafața supusă sterilizării se delimitează cu ajutorul unor șabloane de metal sterilizate sau cu un creion dermatograf. Se șterge bine cu tamponul întreaga suprafață delimitată și apoi se descarcă în serul fiziologic din eprubetă, realizîndu-se astfel o suspensie de germeni — din care se fac diluții succesive în funcție de gradul de încărcare microbiană presupus. Din suspensia nediluată și din diluție se însămînțează cîte 0,1 $cm^3$ pe suprafața mediului de cultură, repartizîndu-se omogen cu ajutorul unei spatule sterile de sticlă. Se incubează 24 h la 37°C, după



Scanned with OKEN Scanner

care se lasă 24 h la temperatura camerei și apoi se numără coloniile dezvoltate. Rezultatul se exprimă în microorganisme pe 1 cm² de suprafață, după următoarea formulă de calcul :

$$\text{Număr microorganisme/cm}^2 = \frac{(n \times 100 \times d)}{N \times S}$$

în care :
n = numărul de colonii citit pe fiecare placă
d = valoarea reciprocă a diluției (de exemplu, 10 pentru diluția 1/10, 100 pentru diluția 1/100 etc.
N = număr de cutii Petri luate în calcul
S = suprafața cercetată (în cm²)

În cazul în care se ia în considerație întreaga suprafață a obiectului cercetat, nu se mai împarte la suprafață.

### 1.9.1.2. **Metoda amprentelor**

Această metodă constă din aplicarea suprafeței de cercetat direct pe suprafața mediului de cultură, lăsîndu-se în contact 15 secunde.

După incubare 24 ore la 37°C se numără coloniile apărute pe suprafața de contact. Se practică în cazul controlului mîinilor prin aplicarea fețelor palmare a degetelor, sau pentru controlul unor alimente. Are dezavantajul că nu permite o raportare la unitatea de suprafață.

### 1.9.1.3. **Metoda peliculelor adezive**

Se folosesc niște etichete cu suprafață cunoscută (2,8 cm²) confecționate dintr-o peliculă adezivă tip scotch. Acestea se aplică pe suprafața de cercetat cu ajutorul unei pense sterile. Apoi se ridică și se aplică pe suprafața mediului de cultură unde se lasă 30 secunde, după care se aruncă. După incubare, pe locul unde au fost puse, se numără coloniile dezvoltate și se raportează la unitatea de suprafață (cm²) sau valorile obținute se analizează în raport cu numărul maxim de germeni stabilit pentru suprafața dată standardizată.

### 1.9.1.4. **Metoda spălării**

Se folosește mai frecvent pentru controlul bacteriologic al mîinilor. Constă din introducerea mîinilor într-un vas cu ser fiziologic steril, în care se fac mișcările obișnuite de spălare a mîinilor. Din suspensia microbiană astfel obținută se fac însămînțări ca atare și în diluție pe suprafața unui mediu solid de cultură. Necesită o cantitate mare de mediu. Calculul se va face pentru întreaga suprafață a unei mîini, ținînd cont de cantitatea inițială de spălare.



Scanned with OKEN Scanner

## 1.9.2. Determinarea indicatorilor microbiologici

După cultivare 24 ore la 37°C — se apreciază numărul total de germeni/37°, numărul streptococilor alfa și beta hemolitici, a stafilococilor și a coliformilor.

Ca medii de cultură se recomandă utilizarea mediului geloză sînge, permițînd dezvoltarea mai bună a indicatorilor luați în considerație. Pentru identificarea coliformilor se folosește mediul Levine.

## 1.9.3. Determinarea fungilor de pe suprafețe

Stabilirea numărului de fungi/cm$^2$ de pe diferite suprafețe din încăperi se face prin metoda ștergerii cu tamponul steril, descrisă mai sus.

Această determinare este folosită și pentru stabilirea gradului de infestare a pereților din încăperile ce prezintă mucegai.

## Bibliografie


1. ARTENSTEIN M. S., DAWSON T. H. În : Aerobiology — Proceedings of the Third International Symposium 1969, Silver I. H. (red.) p. 1, Academic Press, Londra, 1970.
2. BÎLBÎE V., POZGHI N. — Bacteriologie medicală, vol. II, Edit. Medicală, București, 1986.
3. BULLA AL., GOLĂESCU MARIA, HOLAN M. — Micoze viscerale, p. 300, Edit. Medicală, București, 1964.
4. CONSTANTINESCU O. — Metode și tehnici în micologie, Edit. Ceres, p. 36, București, 1974.
5. CUCU M., ANDRONACHE ELENA — Culegeri de lucrări metodologice și documentare. Institutul de Igienă și Sănătate Publică, București, 1964.
6. DART R. K., STRETTON R. J. — Microbiological Aspects of Pollution Control, p. 32, Elsevier, 1980.
7. DRAPEAU A. J., JANKORIC S. — Manuel de microbiologie de l'environnement, O.M.S. Geneva, 1977.
8. FANNON K. F., SPENDLOVE J. C., COLHRON K. W., GANNON J. J. — Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31, 705.
9. GREGORY P. H. — The Microbiology of the Atmosphere, p. 33, Interscience Publishers Inc., New York, 1961.
10. GREGORY P. H. — The Microbiology of Atmosphere, ed. a 2-a, John Wiley and Sons, New York, 1973.
11. HARVEY R. W. S., PRICE T. H., JAYMSON D. H. M. — J. Hyg., 1976, 76, 91.
12. HENDERSEN A. — Sellers and M.R.D. Seaward, Environ, Pollut., 1979, 19, 207.
13. LINZON S. N. — J. Air Pollut. Control Assoc., 1971, 21, 81.
14. MINCU P., ȘERBĂNESCU MARIA — Culegere de lucrări metodologice și documentare. Institutul de Igienă și Sănătate Publică, București, 1964.
15. MOS Mc QUOWIN — Atlas of medical mycology, Wiliams & Wilkins, Baltimore, 1979.
16. MUIR D. C. F. În : Clinical Aspects of inhaled Particles, Muir D. C. F. (red.) p. 1, Heinemann, Londra, 1972.
17. NESTORESCU N. — Bacteriologie medicală, Edit. Medicală, București, 1965.
18. PYATT F. B. — Environ. Pollut., 1970, 1, 45.
19. TELTSCH B., KAZTZENELSON EL. — Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36, 972.
20. ZAVATE OLGA, CAJAL N. — Enterovirusuri nepoliomielitice. Implicații în patologie și poluarea mediului ambiant, Edit. Academiei R.S.R., București, 1983.




Scanned with OKEN Scanner

## 2.1. APA CA FACTOR DE MEDIU. MODALITĂȚI DE POLUARE BIOLOGICĂ A APEI. MICROORGANISME PATOGENE ȘI POTENȚIAL PATOGENE TRANSMISIBILE PRIN APĂ

### 2.1.1. Rolul apei în organism

Apa reprezintă un constituent esențial pentru desfășurarea vieții. Apariția vieții pe Terra s-a realizat inițial în mediul acvatic. În compoziția țesuturilor vii, proporția de apă are valori ridicate, oscilînd între 70 și 90%.

În organismul uman adult proporția de apă reprezintă 60—70% din greutatea corporală. În țesuturile organismelor tinere, proporția de apă este și mai crescută, la copilul nou-născut proporția fiind de 70—80%, iar la embrionul uman 80—90%.

Necesitățile fiziologice de apă ale organismului sînt permanente și sînt reprezentate de 1—2 litri de apă pe zi care se satisfac, atît prin ingestia de apă, cît și sub formă de alimente care conțin și ele apă în proporții crescute. Deperdiția de apă a organismului se realizează prin eliminare din organism prin perspirație tegumentară, urină și fecale, fiind reprezentată de 1—2 litri pe zi. Lipsa completă a aportului zilnic de apă nu poate fi tolerată de organism decît 4—5 zile, după care viața încetează.

Datorită acestor caracteristici, apa reprezintă un factor al mediului ambiant, care influențează și condiționează viața omului, animalelor și plantelor.

Ecologia, știința care se ocupă cu studiul factorilor de mediu și a interrelațiilor organismelor cu mediul, clasifică factorii mediului în naturali și artificiali.

Cei naturali sînt reprezentați de aer, apă și sol, iar cei artificiali, așezările umane, alimentația și locuința. Intersecțiunea complexă a acestor factori ecologici condiționează dezvoltarea sănătoasă și evoluția omului în natură.

Alături de aer, apa reprezintă un element cu rol primordial în apariția și menținerea vieții, ca și în dezvoltarea colectivităților omenești de-a lungul timpului. Dovezile le reprezintă : apariția primelor forme de

viață în mediul acvatic, stabilirea primelor așezări omenești în apropierea rîurilor și fluviilor, faptul că apa reprezintă mediul în care se desfășoară toate procesele metabolice, precum și marea proporție de apă conținută de țesuturile și organele tuturor viețuitoarelor. Constituent esențial al materiei vii, apa reprezintă mediul propice de desfășurare a tuturor proceselor fiziologice ca absorbția, difuzia și excreția, contribuind totodată la menținerea constantelor de bază ale organismului : izotonia, izotermia, echilibrul acido-bazic, metabolismul intermediar etc. Datorită marii sale puteri de dizolvare, apa este mediul în care se petrec numeroase dispersii moleculare. Prin intermediul apei și sub influența enzimelor și sărurilor dizolvate se realizează toate biosintezele și descompunerile care caracterizează însăși viața. Apa ca mediu de reacție permite realizarea proceselor metabolice care asigură refacerea permanentă a țesuturilor vii, fără apă toate aceste procese biologice nemaiputînd fi realizate.

Sursele de apă care pot fi folosite în aprovizionarea cu apă a colectivităților umane sînt reprezentate de cele trei faze ale circuitului apei în natură : apele meteorice (sau de precipitații), apele de suprafață și apele subterane.

## 2.1.2. Apele meteorice

Apele meteorice provin din precipitațiile atmosferice : apele de ploaie și cele rezultate din topirea zăpezilor. Deși pure în momentul formării, vaporii de apă se impurifică încă din momentul condensării lor în jurul particulelor de praf, fum etc. Odată căzute la suprafața solului, apele meteorice se impurifică în continuare cu substanțe organice și anorganice, cu bacterii, ciuperci, virusuri, ouă de helminți și chisturi de protozoare antrenate prin spălarea suprafeței solului pe care ele se scurg pînă la nivelul unde sînt colectate. De obicei, nu îndeplinesc condițiile igienice, motiv pentru care nu sînt indicate pentru alimentarea cu apă de băut. Prezintă debit foarte variabil și adesea redus, conținut crescut în microorganisme, mai ales cînd este păstrată un timp îndelungat și gustul este fad, datorită lipsei de săruri minerale.

În țara noastră, apele meteorice se folosec foarte rar pentru aprovizionarea unor gospodării rurale din regiunile de deal și în unele zone unde apele de suprafață lipsesc, iar apele subterane se găsesc la mari adîncimi.

## 2.1.3. Apele subterane

Apele subterane se formează în urma infiltrării apelor de precipitații prin straturile solului sau a infiltrării apei rîurilor și lacurilor prin albiile acestora și prin condensarea vaporilor de apă din aerul atmosferic. Modul de infiltrare a apelor depinde de natura solului. În cazul solurilor cu permeabilitate redusă, cu o bună capacitate și eficiență de filtrare, apa coboară încet prin pori pînă ajunge la o rocă impermeabilă



Scanned with OKEN Scanner

formînd la suprafața acesteia o pînză de apă subterană. Coborînd, apa se purifică și antrenează substanțele minerale, mineralizîndu-se. Substanțele în suspensie, inclusiv bacteriile, ouăle de paraziți sînt reținute la suprafața particulelor de sol, avînd loc astfel un proces natural de filtrare și purificare a apei. În consecință apele subterane corect captate, înmagazinate și distribuite pot fi folosite fără a mai fi purificate.

În cazul solurilor cu o permeabilitate crescută, apa se infiltrează rapid, rezultă o rețea subterană de canale prin care apa curge sub formă de adevărate pîraie. Aceste ape nefiind suficient filtrate prezintă grade variate de poluare, iar în colectivitățile alimentate cu ape din astfel de teritorii, s-au semnalat adesea episoade de boli hidrice. Apele freatice sînt apele care se acumulează în cursul procesului de infiltrare deasupra primului strat impermeabil și servesc ca sursă de aprovizionare cu apă mai ales colectivităților din mediul rural, care le exploatează prin fîntîni de adîncimi variabile. Cînd se găsesc la adîncimi mici, apele freatice prezintă variații de debit și ale proprietăților organoleptice, fizice, chimice și biologice și sînt frecvent poluate. Folosirea apelor freatice trebuie să se facă în consecință cu precauții : captarea în amonte de sursele de poluare, alegerea unor pînze de apă cu o acoperire de sol filtrant suficient, amenajarea captării și asigurarea zonei de protecție sanitară.

Apele de adîncime se găsesc între două straturi impermeabile, cel inferior permițînd acumularea apei, iar cel superior, acoperitor, asigurînd protecția ei ; apa fiind închisă între cele două straturi se află adeseori sub presiune. Din punct de vedere cantitativ, apele de adîncime au un debit constant, neinfluențat de variațiile precipitațiilor atmosferice, sînt ferite de impurificări și contaminări, iar proprietățile lor fizice și chimice variază mai puțin decît proprietățile apelor freatice, iar din punct de vedere microbiologic, apa este nepoluată.

Apele de profunzime îndeplinesc deci, de obicei, condițiile microbiologice de potabilitate, fiind cu prioritate recomandate pentru aprovizionarea cu apă potabilă a centrelor populate. Adeseori însă ele nu pot acoperi din punct de vedere cantitativ nevoile colectivităților mari, dezvoltate urbanistic și industrial.

### 2.1.4. Apele de suprafață

Apele de suprafață provin din precipitațiile atmosferice, din topirea zăpezilor și din izvoare. Ele curg sau staționează la suprafața solului, conform înclinării acestuia. Compoziția lor variază în funcție de caracteristicile bazinului hidrografic de alimentare, deci de natura rocilor terenurilor din care-și adună apele și pe care le traversează, de anotimp, de aportul și proprietățile altor ape pe care le primesc etc. Ploile și topirea zăpezilor produc modificări importante, deoarece curgînd la suprafața solului, spală și antrenează microorganisme, pesticide, fertilizanți pe care le transportă în apă.

Pe lîngă acestea, apele de suprafață își modifică compoziția pe unele sectoare, chiar pe distanțe apreciabile ca urmare a utilizării lor în anumite scopuri (menajere, industriale, agricole) și în special după deversări



Scanned with OKEN Scanner

de ape reziduale care pot modifica proprietăţile fizico-chimice şi biologice ale apei atunci cînd nu se respectă regulile igienice la deversarea lor. Cînd au debit suficient şi relativ constant, apele de suprafaţă pot fi folosite în aprovizionarea colectivităţilor, însă datorită poluărilor determinate de multiplele folosinţe nu pot fi date în consum direct, ci numai după o prealabilă tratare şi dezinfecţie. Apele de suprafaţă se pot clasifica în ape curgătoare, ape stătătoare şi ape stagnante.

Apele curgătoare sînt constituite din fluvii, rîuri şi pîraie, adevărate canale naturale ale regiunilor pe care le drenează. Rîurile şi fluviile sînt ape curgătoare permanente, deci se pot folosi ca surse de aprovizionare cu apă, dar pîraiele şi torenţii sînt intermitenţi, deci nu se pot folosi în acest scop.

Compoziţia apelor curgătoare variază pe parcurs de la izvor la vărsare. Principala lor caracteristică în alegerea pentru aprovizionarea cu apă a unui centru populat este debitul. Din acest punct de vedere rîurile prezintă variaţii foarte mari de debit în funcţie de perioadele de dezgheţ şi ploi torenţiale, precum şi perioadele de secetă. Rîurile pot fi considerate ca surse posibile de alimentare cu apă numai cînd debitul lor, la nivelul cel mai scăzut, depăşeşte apreciabil cantitatea de apă necesară populaţiei.

Compoziţia apei de rîu este modificată în anumite perioade de apele de şiroire care după ploi şi dezgheţ spală suprafeţele solului, antrenînd diverse impurităţi. Ca urmare, conţinutul în substanţe minerale şi organice, microorganisme, ouă de paraziţi, suspensii şi substanţe chimice folosite în agricultură este mai crescut. Apele de precipitaţii, pe lîngă faptul că diluează conţinutul mineral, cresc şi ele cantitatea de substanţe organice şi microorganisme. Cînd datorită debitului mărit curgerea rîului devine foarte rapidă, microorganismele patogene sînt transportate într-un timp scurt la mari distanţe, astfel că procesele naturale de autopurificare nu mai au timp să se exercite. Aceasta explică apariţia unor episoade de febră tifoidă sau dizenterie la un interval de timp de la apariţia debitului maxim, egal cu perioada de incubaţie a bolii respective. Rîurile conţin o importantă floră microbiană saprofită, adesea şi patogenă.

În cursurile de apă, de regulă există condiţii favorabile de dezvoltare a microflorei saprofite, ceea ce explică conţinutul de zeci sau sute de mii de bacterii pe un $cm^3$ de apă. Numărul bacteriilor coliforme este de asemenea crescut, ajunse în apă ca urmare a descărcării în apele de suprafaţă a reziduurilor fecaloid-menajere provenite din centrele populate, a apelor reziduale rezultate din obiective alimentare şi ca urmare a diverselor folosinţe ale apei, ca scăldat, spălat etc. Cu cît densitatea populaţiei este mai crescută în bazinul de alimentare a cursului de apă respectiv, cu atît conţinutul microbian este mai mare. Deoarece apele rîurilor conţin substanţe organice, microorganisme etc., nu pot fi folosite în alimentaţia populaţiei, decît după o prealabilă purificare şi dezinfecţie.

Lacurile naturale cînd dispun de debite mari pot fi folosite în aprovizionarea cu apă, prezentînd şi avantajul că au bazinul de alimentare mai limitat faţă de apele curgătoare şi deci pot fi mai uşor apărate împotriva poluării. De obicei apa lacurilor este mai curată decît apa rîurilor, deoarece posibilităţile de poluare sînt mai reduse, diluţia eventua-



Scanned with OKEN Scanner

lelor substanțe poluante este foarte mare, iar alți factori ca : timp îndelungat de stagnare, însorire, contribuie și ei la menținerea purității apei. Deși ape stătătoare, apa nu este imobilă, din cauza diferențelor de temperatură iau naștere curenți de apă cu direcție verticală și ca urmare există pe lîngă o stratificare a compoziției chimice și o stratificare microbiană cu populații de bacterii și alge.

### 2.1.5. Lacurile de acumulare

Lacurile de acumulare între apele de suprafață joacă un rol tot mai important în ultima vreme, fiind folosit în multiple scopuri, ca aprovizionarea cu apă a centrelor populate și a industriilor, furnizarea de energie electrică, irigații, sporturi acvatice etc. Zăgăzuirea rîurilor și formarea lacurilor de acumulare sînt factori ce favorizează îmbunătățirea calității apei. Încetinirea vitezei cursului de apă la nivelul lacului face ca procesele de sedimentare să se accentueze, turbiditatea să scadă, iar conținutul microbian să se reducă apreciabil, paralel cu desfășurarea proceselor de sedimentare.

În lacurile adînci din zonele cu climă temperată, stratificarea termică și chimică influențează în mare măsură valorile indicatorilor fizico-chimici, biologici și bacteriologici ai apei. Numărul bacterilor heterotrofe indică două maxime constituite din populații diferite, unul în zona stratului de schimbare a temperaturii și altul în zona de fund a lacului. La nivelul maxim predomină bacteriile de putrefacție, iar cel de-al doilea este constituit predominant de bacterii metalo-oxidante și sulfobacterii.

În lacurile fără stratificare termică, cel mai mare număr de bacterii se constată în zona de puternică dezvoltare a algelor și deasupra fundului lacului. Toamna și primăvara, cînd curenții de apă produc turbulența acesteia, repartiția bacteriilor este mult mai uniformă, iar datorită creșterii conținutului în oxigen, sulfobacteriile anaerobe scad puternic. După precipitații abundente conținutul în bacterii și spori de ciuperci, mai ales în lacurile mici crește intens, dar temporar.

Apa mărilor și oceanelor reprezintă 97,2% din totalul apei de pe Terra și are caracteristica de a fi intens mineralizată. Din cauza mineralizării intense această apă nu poate fi utilizată ca apă potabilă, deși cantitativ ea reprezintă o sursă inepuizabilă.

În unele zone de pe glob, ca Arabia Saudită, Emiratele Arabe din Golful Persic, apa din mări și oceane reprezintă singura sursă de apă accesibilă. Pentru a fi folosită ca apă potabilă, ea este supusă unor tratamente speciale de demineralizare în instalații ce folosesc procedee variate, ca rășini schimbătoare de ioni, distilare, electroliză etc.

## 2.2. POLUAREA BIOLOGICĂ A APEI

Apa fecaloid-menajeră și apa uzată de la abatoare și fermele de animale conțin agenți infecțioși din rezervorul animal-uman.



Scanned with OKEN Scanner

Animalele și oamenii bolnavi ca și purtătorii asimptomatici excretă agenți patogeni care pot mai tîrziu să apară în apa reziduală, nămol și apa de suprafață. Asemenea agenți patogeni sînt reprezentați de virusuri, rickettsii, paraziți, fungi și bacterii.

Cîteva protozoare patogene sînt prezente în : nămol, ape reziduale de canal și apele de suprafață. Astfel de protozoare sînt : Entamoeba și Giardia. Cîteva protozoare potențial patogene adesea prezente în astfel de probe sînt reprezentate de : Trichomonas Hartmanella, Naegleria și Balanditium.

Unii fungi patogeni ca de exemplu : Cryptococcus, Histoplasma, Candida și Trichophyton pot fi prezenți în nămol, apa reziduală de canal și apa de suprafață.

Coxiella burnetti este o rickettsie care poate fi prezentă în nămol, apa reziduală de canal și apa de suprafață, în special în apa poluată de la abatoare și fermele de animale.

Cele mai importante genuri și specii de bacterii patogene care pot contamina apa sînt : Salmonella, Vibrio, Leptospira, Shigella, E. coli, Yersinia, Campylobacter, Prancisella, Brucella, Pseudomonas, Aeromonas, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus grup B și D, Mycobacterium, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, și Legionella. Shigella poate fi transmisă prin apa potabilă contaminată, dar izolarea ei din nămol, apa reziduală de canal este dificilă și inconstantă.

## 2.2.1. Microorganismele patogene transmisibile prin apă

### 2.2.1.1. Virusuri

*Adevovirusurile* dau infecții ale căilor respiratorii superioare și inferioare, congestie oculară, simptome de enterită, uneori cu implicarea sistemului nervos central. Transmiterea este predominat pe cale respiratorie, dar și prin apa din piscine.

*Enterovirusurile* sînt reprezentate de Poliovirusuri, Coxsackie și ECHO. Ele provoacă infecții intestinale, hepatite, meningite și poliomielita. Enterovirusurile se multiplică în tractul intestinal și se elimină cu fecalele.

Transmiterea se face pe cale fecal-orală, dar și prin poluarea fecală a apei potabile și de îmbăiere.

*Reovirusurile* determină infecții ale căilor respiratorii superioare și inferioare, cu diaree, erupție și hepatite, în special la copii.

*Virusul hepatitei A* se multiplică în tractul intestinal și se elimină cu fecale.

Transmiterea se face prin contact de la persoană la persoană și prin poluare fecală a apei potabile și de îmbăiere. Poate fi concentrat și transmis prin moluște care trăiesc în apă poluată, dacă moluștele sînt consumate de oameni.



Scanned with OKEN Scanner

### 2.2.1.2. Bacterii

*Aeromonas*, bacterie potențial patogenă pentru om, poate determina infecții septicemice la gazde cu imunitatea compromisă, diaree, pneumonie, abcese, infecții ale rănilor. Produc septicemii epizootice la animalele cu sînge rece (broaște, salamandre, șerpi, pești). Sursa de infecție este apa de suprafață, în special apa cu conținut mare de compuși organici, apa din puțuri și animalele cu sînge rece.

Transmiterea infecției se face prin contactul cu apa de suprafață, ingestia, aspirația apei de suprafață sau consumarea de alimente produse în mediile acvatice contaminate (moluște comestibile).

*Campylobacter jejuni* — *Campylobacter coli* determină boli diareice umane și animale. Rol etiologic posibil în ulcerul gastroduodenal. Microorganismul se găsește în biocenoza intestinală a porcilor, păsărilor, cîinilor și oamenilor.

Transmiterea se face prin alimente sau mîini contaminate, și uneori prin apă.

*Clostridium botulinum* se întîlnește sub formă sporulată în sol, pe vegetale și în sedimentele de pe fundul mării și apelor dulci. Sporii pătrunși în organismul uman și animal se transformă în formă vegetativă care elaborează toxine în condițiile de anaerobioză ce se realizează în țesuturile devitalizate. Peștii din apele poluate sînt adesea contaminați cu Clostridium botulinum. Toxina este produsă la temperaturi peste 6°C pentru tipul E și peste 12°C pentru alte serotipuri (A, B, C, D și E). Omul se îmbolnăvește prin consum de alimente contaminate și toxinele conținute în produsele alimentare. Toxina este distrusă prin fierbere.

*Clostridium perfringens* — Clostridium perfringens tip A produce gangrenă gazoasă la oameni și animale. Clostridum perfringens tip B produce enterite, iar tipul C forme de enterite necrotice la oameni și animale.

Bacilii perfringens fac parte din microbiocenoza intestinală a omului și animalelor și se elimină prin fecale, de asemenea prezente în sol și nămol, ape reziduale și îngrășăminte naturale sub forma sporulată.

*Escherichia coli* enteropatogen, enterotoxic și enteroinvaziv, provoacă gastroenterite. Sensibili sînt oamenii, în special copiii și animalele domestice. Transmiterea infecției se realizează prin poluare fecală a apei potabile, și a apelor neclorinate din bazine de înot și stranduri în aer liber.

*Francisella tularensis* provoacă la oameni și animale cu sînge cald, în special rozătoare, tularemia. Transmiterea infecției se realizează prin sîngele supt de artropode, ectoparazite, pe cale respiratorie, ingestie și contact direct. Microorganismele penetrează direct prin tegumente și mucoase cauzînd numeroase infecții transmise prin apă ; au fost semnalate în U.R.S.S., S.U.A., Canada și Turcia.

*Klebsiella* determină infecții ale tractului urinar și aparatului respirator. Microorganismul este larg răspîndit în natură, în sol, apă și în mod normal găsit în biocenoza intestinală a oamenilor și animalelor. Poate, de asemenea, să se înmulțească în apa utilizată de industria pastei și hîrtiei și s-a constatat că efluentul de la o singură mașină de fa-



Scanned with OKEN Scanner

bricat hîrtie poate conține tulpini de Klebsiella și coliformi în număr de același ordin de mărime ca și pentru apa reziduală de canal a orașelor.

Klebsiella reprezintă un risc potențial pentru sănătate în cazul diferitelor utilizări ale apei potabile poluate fecal ; de asemenea, un risc de transfer a rezistenței față de antibiotice prin factori R la alte tulpini patogene de enterobacterii.

*Leptospira* determină la om infecție generalizată febrilă cu nefropatie, conjunctivită, uneori icter. Microorganismul se transmite prin urina animalelor domestice și sălbatice (rozătoare, porcine, bovine), care contaminează apa. Leptospirele sînt capabile să penetreze prin mucoase și tegumente intacte. Infecția poate fi contractată prin spălarea sau scăldatul în ape contaminate. Leptospirele patogene pot supraviețui doar cîteva ore în apa de mare și cîteva zile în apele dulci.

*Listeria (Listeria monocytogenes)* poate determina meningite, encefalite, septicemii, endocardite, avorturi și abcese.

Microorganismul se elimină prin dejectele animalelor domestice și sălbatice, păsări și oameni, și ajung pe vegetale și în apa reziduală de canal. Transmiterea se face prin alimente și apă contaminate.

*Mycobacteriile (M. tuberculosis, M. bovis, M. avium, și mycobacterii atipice)* determină, la om, animale și păsări, tuberculoza și micobacterioze. Microorganismele se elimină prin spută și fecalele omului și animalelor ; în consecință mycobacteriile pot fi prezente în apa reziduală de canal și nămol, în special de la sanatoriile de tuberculoză. Transmiterea infecției se face pe cale respiratorie și prin ingestia apei poluate în timpul îmbăierii. Vitele și alte animale domestice se pot infecta prin consum și apă contaminată. Mycobacteriile supraviețuiesc în natură perioade lungi de timp.

*Pseudomonas aeruginosa* provoacă infecții otice și oculare, infecții ale plăgilor, arsurilor, ale căilor urinare și enterite. Microorganismul se întîlnește în sol și apă. Poate fi izolat din produse clinice, în mediul de spital. Infecția se poate transmite prin apa de îmbăiere contaminată, stranduri și bazine de înot. Densitatea mai mare decît 100 bacterii/ 100 ml poate expune înotătorii la doze infectante. De asemenea, prin apa minerală și băuturi răcoritoare îmbuteliate defectuos. În mediul de spital poate determina infecții nosocomiale.

*Salmonella typhi și paratyphi A și B* determină febrele tifoidă și paratifoide. Microorganismul se localizează în intestinul bolnavilor și la purtătorii sănătoși. Se elimină prin fecale și urină. Transmiterea infecției se face fecal-oral de la bolnavi și purtători, dar și prin apa potabilă poluată fecale care este un mod obișnuit apă contaminată cu Salmonella typhi. De asemenea, prin alimente contaminate. Salmonella typhi și paratyphi pot fi concentrate în moluștele ce trăiesc în apa poluată și transmise prin consumarea acestora, proaspete. Cîteva celule bacteriene pot fi suficiente pentru a alcătui o doză infectantă.

Genul *Salmonella* are peste 1 000 de specii, poate determina infecții enterice, gastroenterite și toxiinfecții alimentare. Microorganismele se multiplică în intestinul animalelor și omului, iar excretorii asimptomatici sînt frecvenți ; se pot multiplica și în alimente. Salmonellele sînt cei mai



Scanned with OKEN Scanner

frecvenți agenți ai toxiinfecțiilor cauzate de alimente. În apă sînt necesare doze relativ mari pentru a determina apariția infecției.

*Shigella* (S. flexneri, S. dysenteriae, S. sonnei, S. boydii) provoacă dizenterie, cu frecvență mare în climatul umed și cald. Tropism : oameni și maimuțe antropoide. Habitatul microorganismului : tractul intestinal al omului și maimuțelor în cazul ambelor categorii — bolnavi și purtători sănătoși ; produse alimentare perisabile sînt frecvent contaminate. Transmiterea se face prin alimente contaminate, prin apă poluată fecal sau muște. Epidemiile cauzate de apă survin în asociere cu contaminarea fecală. Infecțiozitatea Shigellelor este foarte mare, doza infectantă poate fi reprezentată de cîteva celule bacteriene.

*Staphylococcus* determină o largă paletă de infecții și intoxicații alimentare : furuncule, abcese, meningite, septicemii, osteomielite, otite, supurații ale rănilor și toxiinfecție alimentară. Larg răspîndit în mediul ambiant se întîlnește în microbiocenoza tegumentelor, glandelor pielii și mucoaselor la animale cu sînge cald și om. A fost găsit în bazine de înot și ape naturale de îmbăiere. Transmiterea infecțiilor are loc prin soluții de continuitate la nivelul tegumentelor și mucoaselor nazofaringiene. Transmiterea prin apa de îmbăiere este suspectată, dar încă nedovedită experimental.

*Streptococi hemolitici de grup A și C Lancefield* determină infecții respiratorii. Transmiterea microorganismelor se face pe cale respiratorie. A fost găsit în piscinele de înot și apele naturale de îmbăiere.

Transmiterea prin apa de îmbăiere nu a fost încă dovedită experimental.

*Streptococi de grup D Lancefield (incluzînd S. faecalis, S. faecium, S. bovis și S. equinus)* determină infecții urinare și endocardită bacteriană subacută. Microorganismele fac parte din microbiocenoza intestinală a oamenilor și se elimină prin fecale. S. faecalis este folosit ca indicator sanitar complementar de poluare fecală a apei potabile și alimentelor.

*Vibrio cholerae (Vibrio El Tor)* — Boală exclusiv umană este holera endemică în India, Asia de Sud-Est și în alte părți ale globului. Vibrionul holeric se transmite pe cale fecal-orală și este excretat prin fecalele bolnavilor și purtătorilor sănătoși.

Apa potabilă contaminată este un important mijloc de transmitere, dar poate fi, de asemenea, răspîndit prin alimente contaminate.

*Vibrionii neaglutinabili (de grup non 0 : 1)* determină gastroenterite. Microorganismele se întîlnesc în apa reziduală de canal, apa de suprafață și produse alimentare din medii acvatice, în special midii și stridii. Transmiterea se face prin apă, alimente contaminate, și moluște din apa poluată. Păsările pot, de asemenea, să joace un rol în răspîndirea acestor microorganisme.

*Yersinia enterocolitica* produce infecții intestinale, artrite acute și cronice, eritem nodos, glomerulonefrite. Microorganismele se întîlnesc în intestinul uman, la porcine, rozătoare, broaște, pești, melci și în apa de suprafață și freatică poluată fecal. Transmiterea este directă fecal-orală de la persoană la persoană și prin alimente contaminate. Yersinia a fost găsită în apă și la pești, atestînd astfel că apa poate fi importantă în transmiterea infecției.



Scanned with OKEN Scanner

*Cyanobacterii* — Cunoscute sub numele de Cyanophycese sau alge verzi-albastre. Cîteva tulpini ale unor specii de Cyanophycese s-au dovedit a fi producătoare de toxine, care pot fi transmise la oameni și animale, prin apă. Speciile raportate ca incluzînd tulpini producătoare de toxine sînt : Microcystis, Nodularia spumigena, Anabaena, Aphynizomenon, Coelosphaerium, Gleotrichia echinulata.

Dozele mari produc paralizii generale cu o mortalitate mare la animale. Dozele mici produc reducerea producției de lapte la vaci, oboseală generală, fotofobie și salivație, diareea și constipația. Pot produce reacții alergice la oameni ce se îmbăiază în apă contaminată. Raportată de Australia, Canada, Danemarca, Republica Federală Germania, Israel, Africa de Sud, S.U.A. și U.R.S.S. Microorganismul se întîlnește în ape din zăgazuri și lacuri eutrofice.

### 2.2.1.3. Fungi

*Candida albicans* produce candidoze cutaneo-mucoase și viscerale. Microorganismul se întîlnește pe mucoasele și tractul respirator și digestiv al oamenilor și animalelor. Găsit în apa reziduală de canal, bazine de înot și frecvent izolat în număr mare din apele industriale utilizate în industriile petrochimice. Este suspectată în transmiterea prin apă de îmbăiere, dar nedovedită încă experimental.

### 2.2.1.4. Protozoare

*Balantidium coli* produce enterocolită dizenteriformă. Microorganismul face parte din biocenoza intestinală a porcinelor. Transmiterea infecției se face pe cale directă fecal-orală, prin alimente și apă poluată fecal. Boală cu caracter profesional în marile complexe zootehnice de porcine.

*Entamoeba histolytica* determină sindromul de enterocolită disenterică. Larg răspîndită în țările cu climat tropical din Africa, Asia, Orientul Mijlociu, America Centrală și de Sud. În țara noastră este eradicată.

Protozoarul se localizează în intestinul bolnavilor și purtătorilor. Prin deversări de dejecte poate fi prezent în apa reziduală de canal și nămolul din canale.

*Giardia lamblia* determină enterocolită cu duodenojejunită. Parazitul are o distribuție largă. Prezent în fecale și medii contaminate (sol, apă de suprafață, apă reziduală de canal, bazine de înot). Transmiterea directă fecal-orală de la individ la individ, este calea cea mai frecventă de răspîndire a lambliazei. Contaminarea fecală a alimentelor și apei are de asemenea, un rol important. În S.U.A. au fost descrise în ultimii ani epidemii hidrice de lambliază.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.2.1.5. Helminți

### NEMATODE

*Oxyuris (Enterobius vermicularis și Ascaria lumbricoides)* provoacă helmintiaze intestinale : oxyuriaza și ascaridoza. Transmiterea se face prin ouăle nematodelor care sînt eliminate cu fecalele. Periculoase pentru om sînt efluenții de apă reziduală de canal și nămolul uscat utilizat la fertilizare. Transmiterea prin apa strandurilor și bazinelor de înot, intens poluate fecal este posibilă, mai frecventă este însă transmiterea ouălor prin fructe și zarzavaturi nespălate.

*Dracunculus medinensis* determină filarioza de Guineea, sau dracunculoza răspîndită în Africa, India și alte țări din climatul tropical și subtropical. Embrionii viermelui se dezvoltă în intestinul uman la bărbați și femei. După fecundare, femela părăsește intestinul și migrează către țesuturile subcutanate unde ea ajunge la întreaga sa dezvoltare și poate atinge 0,3—1 m lungime. Cînd este matur, aproape întreg viermele este ocupat de uter, care este plin de larve încolăcite sub formă de spirală. În final, el migrează în tegumentele de la picior sau gleznă, pentru a descărca embrionii în apă. Noii embrioni eliminați caută o gazdă intermediară, care este un crustaceu — Cyclopul. Dacă Cyclopii sînt înghițiți de om prin apa de băut, ei sînt digerați de sucurile gastrice și larvele eliberate. Transmiterea se face prin apa potabilă infestată.

Cyclopii sînt înlăturați prin filtrare pe paturi de nisip, prin tratarea în exces cu calciu și prin fierberea apei (sau încălzirea la 65°C). Cyclopii sînt rezistenți la doze comparativ mari de clor.

*Oncocerce volvulus* — Oncocercoza, este o filarioză larg răspîndită în țările tropicale ale Africii, mai ales Orientul Mijlociu și în America de Sud, mai ales, în Mexic, Guatemala, Columbia și Venezuela. Produce orbirea în proporție de 70—80%, boală supranumită „orbirea de apă". Parazitul se localizează în țesutul celular subcutanat al omului unde se acumulează sub forma de noduli subcutanați de dimensiunile unei cireșe pînă la o mandarină. Prezintă fenomen de migrație accentuat cu tropism pentru țesutul ocular.

Omul este singurul izvor de infestație. Transmiterea bolii se face prin înțepătura unor insecte hematofage din genul Simulium, care-și depun ouăle în apele de rîuri și lacuri. Combaterea și profilaxia se realizează prin insecticide care se pulverizează la suprafața apelor.

*Dibotriocephalus latus (Diphyllobothrium latum)* provoacă botriocefaloza prin infestarea intestinului cu această tenie.

Tropism : oameni și animale. Țările mai cu seamă afectate sînt : U.R.S.S., Finlanda, S.U.A., Canada, Japonia, Filipine, Chile și Africa. În țara noastră la populația de pescari din Delta Dunării.

Viermele adult se întîlnește la om și cîine. Ouăle sînt eliminate prin fecale. Apa poate fi contaminată cu apa reziduală de canal sau direct de cîini. În apă, ouăle se dezvoltă în embrioni în timp de două săptămîni și apoi găsesc prima lor gazdă intermediară : un crustaceu (Cyclop, Diaptomus). Crustaceele infectate sînt ingerate de pești (știucă, biban, somon, păstrăvi) și larvele se dezvoltă în formele plerocercoide infestante



Scanned with OKEN Scanner

în carnea și icrele peștilor. Omul și cîinele se infestează mîncînd pești proaspeți sau gătiți necorespunzător, sau icre. Peștele se infestează trăind în ape poluate fecal.

*Trematodela* determină fascioloza sau distomatoza și schistosomiaza, foarte răspîndită în Egipt, în țări ale Africii, India, China, Laos, Thailanda, Filipine și Africa de Sud. Doar cîteva cazuri au fost raportate în Europa, deși fascioloza ficatului este ceva neobișnuit. În prezent, se întîlnesc mai frecvent datorită răspîndirii sistemului de irigare a culturilor legumicole.

*Schistosoma haematobium* determină schistosomiaza vezicii urinare. Ouăle sînt eliminate în urină, rar în fecale. Răspîndită în Egipt și alte părți ale Africii.

*Schistosoma mansoni și japonicum* provoacă schistosomiaza intestinală. Ouăle sînt eliminate prin fecale, rar în urină. Infestația este larg răspîndită în America de Sud, Africa și Asia. Schistostomele trăiesc în vena portă și ramurile ei și în venele mezenterice. Ouăle ajung în apă prin poluare cu fecale, din care ies larve ciliate (miracidia). Acestea mor după aproximativ 24 h, afară de cazul cînd ajung la o gazdă intermediară, un melc de apă dulce. Aici, larva devine sporocist care dă mai departe alți sporociști. Aceștia produc un mare număr de cercari care părăsesc melcul și înoată activ în apă. Ei mor după aproximativ 48 h, afară de cazul cînd găsesc o cale de acces la corpul omenesc. Accesul se realizează prin penetrarea prin tegumentele intacte sau a mucoaselor gurii, dacă apa este înghițită. Ei intră apoi în curentul sanguin, sînt purtați la ficat și vena portă și se transformă în adulți masculi și femele în timp de aproximativ 2 luni.

Contactul extern cu apa conținînd cercari, în timpul spălării și înotului, este cel mai comun mod de infestare.

În apele reziduale și rezervoarele de apă, microorganismele patogene, virusurile și paraziții pot fi prezenți în mod intermitent și sporadic. Bacteriile patogene sînt, în general, mai numeroase decît bacteriile nepatogene și demonstrarea patogenității va depinde mult de capacitatea selectivă a substratului folosit. Decelarea lor face necesară folosirea unor volume mai mari de probe de apă, decît acelea utilizate pentru examinarea convențională a apei. Dificultăți speciale, caracterizînd astfel de examinări, subliniază importanța standardizării internaționale a mediilor de cultură, membranelor filtrante și metodelor biochimice și serologice utilizate. În plus, este necesară și standardizarea modului de recoltare, a volumelor de apă, transportul probelor etc., ceea ce reprezintă o condiție de bază pentru comparabilitatea rezultatelor. Toate aceste aspecte reprezintă preocupări actuale ale experților O.M.S. în larga problematică a deceniului 1980—1990, sub semnul asigurării de apă sănătoasă pentru întreaga populație a globului.

## 2.3. INDICATORI BACTERIOLOGICI

Majoritatea bolilor transmise prin apă au ca agenți etiologici microorganisme eliminate prin tubul digestiv. De aici rezultă că prima și cea mai importantă condiție bacteriologică de potabilitate a apei este



Scanned with OKEN Scanner

absența din apă a enterobacteriilor patogene. Punerea în evidență a acestora în apă fiind destul de dificilă datorită pe de o parte metodelor mai complicate, iar pe de altă parte a inconstanței prezenței lor în apă, specialiștii în probleme de bacteriologia apei au pus la punct metode pentru decelarea microorganismelor enterice din componența microbiocenozei intestinale, care sînt ușor de izolat și identificat. Este logic să se procedeze la cercetarea microorganismelor prezente în mod normal în materiile fecale ale omului și animalelor cu sînge cald, care devin astfel indicatori de poluare fecală a apei, prezența lor relevînd posibilitatea prezenței enterobacteriilor patogene. Invers, absența microorganismelor din biocenoza intestinală, indică absența aproape certă a microorganismelor patogene. Prin urmare, utilizarea microorganismelor din biocenoza intestinală ca indicatori ai poluării fecale mai degrabă, decît cercetarea microorganismelor patogene, este un consens universal admis pentru supravegherea și evaluarea calității microbiologice a apei. Există însă cîteva condiții pe care trebuie să le îndeplinească acești indicatori ai poluării fecale a apei și anume :

— să fie prezenți constant și în cantitate mare în materiile fecale ale omului și animalelor cu sînge cald ;

— să fie absenți sau puțin numeroși în mediul exterior sau în alte surse ;

— să fie ușor de izolat, identificat și numărat prin examene bacteriologice simple și rapide ;

— să permită stabilirea unei relații cantitative între numărul lor și nivelul de poluare al apei ;

— să fie incapabili să se multiplice în apă ;

— să supraviețuiască în apă timp mai îndelungat decît microorganismele patogene și să reziste un timp cît mai apropiat de cel al patogenilor, a căror prezență o indică la acțiunea dezinfectanților.

### 2.3.1. Numărul total de germeni

Un prim indicator este reprezentat de numărul de bacterii din apă, care se dezvoltă la 37°C sau microorganismele mezofile. Cu cît numărul acestor bacterii mezofile este mai mare, cu atît se poate presupune că între ele se pot întîlni și microorganisme patogene. Cele mai multe microorganisme din sistemele naturale ale apei sînt capabile de creștere la o temperatură cuprinsă între 10—25°C. Acestea formează flora psihrofilă a apei.

Studiile efectuate au evidențiat că între aceste două flore există un raport de 3 : 1 în favoarea florei psihrofile în condițiile naturale. Cu cît acest raport se micșorează, sau se inversează în favoarea florei mezofile, cu atît nivelul de poluare al apei este mai probabil și pericolul prezenței bacteriilor patogene mai crescut.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.3.2. Germenii coliformi

Deși numărul de bacterii mezofile este un indicator util de apariția poluării, mai există situații cînd numărul lor s-a situat în limite acceptate și totuși au apărut epidemii hidrice. Astfel a apărut necesitatea adoptării unor indicatori complementari de poluare. Microorganismele cele mai mult utilizate ca indicatori ai poluării fecale sînt reprezentați de grupul coliformilor în totalitate și coliformilor fecali (Escherichia coli) în special. Grupul coliformilor este larg răspîndit în natură și nu este considerat de o importanță epidemiologică directă pentru examinarea apelor. Deși nu este exclusiv de origine fecală, grupul coliformilor este prezent în cantitate mare în materiile fecale ale omului și animalelor cu sînge cald, ceea ce permite decelarea lui, chiar după o diluare considerabilă. Decelarea coliformilor fecali (termotoleranți), în special a Escherichiei coli, este dovada indiscutabilă a unei poluări fecale.

Termenul „coliformi totali" folosit, sau grupul coliformilor se referă în mod obișnuit la un anumit grup de bacterii aparținînd familiei Enterobacteriaceae (din genurile Escherichia, Citrobacter, Enterobacter și Klebsiella), caracterizat ca bacili gram negativi, nesporulați, oxidazo-negativi, capabili să se dezvolte în prezența de săruri biliare și a altor agenți cu acțiune de suprafață, capabili să fermenteze lactoza la 35—37°C cu producere de acid și gaz în timp de 24—48 h.

Coliformii care prezintă aceste caracteristici metabolice și la temperatura de 44 ± 0,5°C sînt numiți fecali sau termotoleranți. Acești coliformi fecali care determină fermentarea lactozei la 44 ± 0,5°C cu producere de acid și gaz și care formează, de asemenea, indol la 44 ± 0,5°C pornind de la triptofan sînt considerația ca E. coli.

S-au făcut cercetări pentru a pune la punct metode selective pentru detectarea bacteriilor coliforme de certă origine fecală. Rezultatele obținute cu aceste metode pentru coliformii fecali au arătat că acest grup de enterobacterii este un indicator mai bun al poluării cu conținut intestinal de la animale cu sînge cald, decît metoda tradițională a coliformilor totali, atunci cînd s-a folosit în investigarea poluării rîurilor, sistemelor de tratare a apei etc.

## 2.3.3. Streptococii fecali (enterococii)

Un alt indicator al poluării fecale a apei este reprezentat de grupul streptococilor fecali sau enterococi ce fac parte din microbiocenoza intestinului uman și animal. Streptococii fecali aparțin familiei Straptococcaceae, grupul D Lancefield (Streptococcus faecalis, Streptococcus faecalis var. zymogenes, liquefeciens, Streptococcus faccium var. durans, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus și Streptococcus avium) și se prezintă sub formă de coci ovalari, izolați sau în perechi și lanțuri scurte, gram pozitivi, imobili, capabili să crească și să se multiplice la temperatura de 45°C în prezența de 40% săruri biliare și azidă de sodiu (inhibitoare pentru coliformi și majoritatea celorlalte bacterii gram negativ), pe medii cu pH 9,6 și pe medii conținînd 6,5% clorură de sodiu.



Scanned with OKEN Scanner

Streptococii fecali pot supraviețui un timp mai îndelungat în apă față de grupul coliformilor, dar se găsesc în proporție mai redusă în fecalele umane, decît coliformii fecali.

Studii amănunțite privind incidența izolării streptococilor fecali din apele fecaloid-menajere, apele de șiroire rezultate în urma ploilor și furtunilor, apele din crescătoriile piscicole, dejecte umane și ale diferitelor mamifere domestice și sălbatice, a păsărilor, din plante și insecte, au furnizat date noi care au dus la reevaluarea semnificației sanitare a sistemului indicator coliformi fecali — streptococi fecali. Astfel, streptococii fecali sînt prezenți în număr mai mare decît bacteriile coliforme în dejectele rezultate de la fermele de animale, de la cîini, pisici și diferite animale sălbatice. Apele de șiroire, de asemenea conțin un număr mai crescut de streptococi fecali decît coliformi fecali. Dimpotrivă, dejectele umane și apele fecaloid-menajere conțin de cel puțin de 4 ori mai mulți coliformi fecali decît streptococi fecali.

Speciile Streptococcus bovis, Streptococcus equinus și Streptococcus avium sînt indicatori ai poluării fecale cu dejecte de la mamifere și păsări și ca urmare, acest grup indicator al poluării fecale poate fi folosit la situații în care apele sînt poluate cu dejecte de la fermele de animale, de la crescătoriile de păsări, reziduurile de la fabricile de lapte, de prelucrare a cărnii, derivatelor de carne. Aceste trei specii de stafilococi fecali nu rezistă mult în afara tractului intestinal fiind rapid inactivate în mediul ambiant. Ca urmare, prezența lor în apă constituie un indicator sensibil al poluării fecale foarte recente față de celelalte două specii. Streptococcus faecalis și faecium prezente în fecalele umane și mult mai rezistente la condițiile de mediu.

Alături de coliformii fecali, datorită rezistenței lor deosebite la agenții fizici, chimici și biologici, streptococii fecali au o importantă valoare sanitară ca indicatori de poluare fecală a apei. Au existat situații în care prin analiza bacteriologică a apei nu au fost puși în evidență coliformi fecali (care sînt mai puțin rezistenți la procesul de dezinfecție a apei prin clorurare decît streptococii fecali), dar s-au izolat streptococi fecali. Astfel, acest indicator de poluare fecală amplifică sensibilitatea metodei de decelare a poluării fecale a apei și o face mai fiabilă prin folosirea a doi indicatori, în loc de unul.

### 2.3.4. Germenii anaerobi sulfito-reducători

Al treilea grup de bacterii, care au o valoare sanitară ca indicatori ai poluării fecale a apei alături de coliformii fecali și streptococii fecali, este constituit de grupul sporulaților anaerobi sulfito-reducători al cărui reprezentant de interes primordial este specia Clostridium perfringens. Sporulații anaerobi sulfito-reducători se găsesc în număr mai redus decît coliformii și streptococii fecali în intestinul uman și sînt reprezentați în proporție de 90—95% de specia Clostridium perfringens. Concentrații asemănătoare s-au găsit în ape reziduale fecaloid-menajere. Decelarea acestor sporulați anaerobi are o importanță secundară pentru stabilirea unei



Scanned with OKEN Scanner

poluări fecale recente. Cînd se decelează prezența clostridiilor sulfito-reducătoare într-o apă poluată fecal, coliformii și streptococii fecali sînt prezenți în cantități mult superioare, sau pot fi absenți pentru că sporii clostridiilor pot să supraviețuiască în apă perioade îndelungate și să persiste atunci cînd toate celelate bacterii de poluare fecală au dispărut. Prin urmare, acest indicator prezintă o valoare deosebită pentru evaluarea unei poluări îndepărtate sau intermitente. De asemenea, acești sporulați anaerobi pot fi utilizați ca indicatori ai supraviețuirii patogenilor sporulați în diferite etape de tratare a apei reziduale cu intensă poluare fecală și ca test de eficiență bacteriologică în procesele de epurare a nămolului.

În ultimii ani a crescut interesul acordat acestui grup ca indicator al prezenței poluării fecale în nămolul lacurilor și cursurilor de apă lente, deoarece apa poate prezenta fluctuații mari ale concentrațiilor de microorganisme indicatoare ale poluării fecale datorită acțiunii curenților, sedimentul de nămol putînd servi la concentrarea bacteriilor și oferind o mai mare stabilitate pentru decelarea indicatorilor de poluare fecală. Sporii bacteriilor anaerobe pot rezista un timp îndelungat în nămol, fiind astfel utili pentru estimarea poluării de lungă durată prin compararea concentrației de spori cu creșterea adîncimii sedimentului de nămol.

Reprezentantul principal al sporulaților anaerobi de origine intestinală, sulfito-reducători, Clostridium perfringens este un bacil sporulat și capsulat, gram pozitiv, imobil, capabil să reducă sulfitul la sulfură feroasă neagră într-un mediu de cultură, a cărui temperatură optimă de dezvoltare a formei vegetative este de 45°C, care coagulează laptele cu formare de cheag alveolar (coagul de aspect spongios) și produce lecitinază.

Utilizarea speciei Clostridium perfringens ca indicator de calitate a apei a fost multă vreme controversată. În ultimii ani s-a cercetat valoarea coliformilor fecali ca indicatori de poluare fecală a apei, comparativ cu alți indicatori de poluare fecală, ca streptococii fecali și Clostridium perfringens, din mai multe considerente : 1) prezența unor agenți patogeni ca enterovirusurile umane în ape naturale care au fost desemnate corespunzătoare din punct de vedere igienic pe bază de cantități mici de coliformi fecali ; 2) capacitatea coliformilor fecali de a se multiplica în anumite condiții în apele naturale ; 3) posibilitatea ca unii coliformi fecali să nu provină din sursa fecală ; 4) după cum evidențiază rezultatele experimentale, coliformii fecali sînt mai puțin rezistenți la dezinfecție decît enterovirusurile umane sau mai puțin stabili în apele naturale. Bazat pe aceste cercetări s-au făcut studii de reevaluare a datelor privind siguranța coliformilor fecali ca indicatori de calitate a apei și s-a tras astfel concluzia că specia Clostridium perfringens reprezintă un indicator complementar util al poluării fecale a apei, deoarece este consecvent prezent în apa fecaloid-menajeră în concentrații de $10^3$ pînă la $10^4/100$ $cm^3$ și pentru că rezistența sa la clorurare și factorii de mediu este asemănătoare cu aceea a enterovirusurilor. În ceea ce privește semnificația sanitară a raportului coliformi fecali — Clostridium perfringens pentru dejectele umane și apele fecaloid-menajere ce conțin cel puțin de 4 ori mai mulți coliformi fecali decît streptococi fecali ($>4$), acesta se caracterizează prin procente mult mai mari de coliformi fecali — Clostridium perfringens ($>100$).



Scanned with OKEN Scanner

Cu toate că este mai rar utilizat în SUA, un număr de țări europene îl recomandă ca un indicator complementar alături de alte teste de calitate a apei, în special în anumite situații. Printre acestea se numără: examinarea apelor clorurate și a apei netratate, conținînd reziduuri industriale letale pentru bacteriile nesporulate, probe recoltate cu mai mult de 12 ore înaintea efectuării analizei, în situații cînd este urmărită atît decelarea poluării îndepărtate, cît și a celei recente a apei.

În directivele de calitate OMS pentru apa potabilă din 1986, se arată că datorită faptului că sporii acestor clostridii sulfito-reducătoare pot supraviețui mai mult timp în apă decît grupul coliformilor și rezistă la dezinfecție cînd concentrația, pH-ul sau durata contactului nu sînt satisfăcătoare. Persistența lor în apele dezinfectate indică prezența deficiențelor în procesele de tratare a apei. Totuși se recomandă să nu se folosească aceste microorganisme în supravegherea de rutină a rețelei de distribuție. Cum ele tind să supraviețuiască și să se acumuleze, se riscă să se regăsească foarte departe în timp și spațiu de punctul de origine al poluării, ceea ce poate da naștere la false alerte.

Cel puțin în parte, controversa asupra valorii speciei Clostridum perfringens ca indicator de poluare fecală pare a fi datorită determinărilor cantitative a grupului heterogen de bacterii sulfito-reducătoare sporulate anaerobe, pe de o parte, iar pe de altă parte utilizării unor metode de lucru destul de imprecise.

### 2.3.5. Bacteriofagii enterici

Ca urmare a faptului că în întreaga lume contaminarea virală a apelor a crescut, atenția cercetătorilor s-a concentrat nu numai asupra riscurilor pentru sănătate asociate acestei creșteri, ci și asupra mijloacelor de control eficient a contaminării virale.

Bacteriofagii enterici sînt virusuri adaptate la parazitismul intracelular al entrobacteriilor. Ca urmare, aria de răspîndire a bacteriofagilor enterici în mediul extern corespunde ariei de răspîndire a enterobacteriilor. Din intestinul uman și al animalelor, bacteriofagii enterici sînt diseminați în mediu, prezența lor putînd fi decelată și în apă.

În cercetarea sanitară a apei se folosesc bacteriofagul antitific Vi și bacteriofagul anticoli, ca indicatori ai nivelului de poluare biologică a apelor. Alături de alți doi indicatori, coliformii fecali și streptococii fecali, decelarea bacteriofagilor enterici completează aprecierea poluării fecale a apei.

Fagii enterici reprezintă și un indicator indirect al poluării cu virusuri enterice avînd în vedere faptul că determinarea indicatorilor bacteriologici obișnuiți ai poluării fecale nu poate constitui un indicator valabil pentru poluarea virală a apei.

Decelarea bacteriofagilor coli și TyVi din apă la rîndul lor virusuri, mai rezistenți la procesele de tratare a apelor, reprezintă un indicator mai bun de apreciere a poluării enterovirale cu toate că nu s-a putut stabili o corelație directă între nivelul bacteriofagilor enterici și enterovirusurile Polio, Echo, Hepatita A. Bacteriofagii enterici fiind mai rezis-



Scanned with OKEN Scanner

tenți la acțiunea dezinfectantă a clorului decît coliformii și streptococii fecali, pot oferi informații suplimentare asupra eficienței dezinfecției apei prin clorurare în instalațiile centrale de aprovizionare cu apă a marilor orașe și sesiza astfel din timp constituirea potențialului de risc pentru sănătatea colectivității ce rezultă din oscilațiile dozelor de clor utilizate la dezinfecția apei.

Izolarea bacteriofagilor antitifici Vi capabili să se multiplice numai pe tulpina ce posedă antigen Vi (ag Vi = antigen de înveliș ce a fost descris și prezența acceptată numai la Salmonella typhi și paratyphi C), dă indicații și asupra prezenței S. typhi în acea apă, dovedindu-se astfel de o importanță deosebită epidemiologică.

## 2.3.6. Pseudomonas aeruginosa

Utilizarea și a altor microorganisme, ca de exemplu specia Pseudomonas aeruginosa, a fost preconizată pentru a evalua calitatea igienică a apei. Este o specie bacteriană larg răspîndită în natură (apă, sol), frecvent izolată însă și de pe mucoase, piele și tubul digestiv al omului (15—33%) și animalelor sănătoase. Apare în dejectele umane la cantități mult mai mici decît coliformii, de unde și controversa din literatura de specialitate privind luarea în considerare a intestinului uman ca habitat principal susținută de numărul mai mic din fecale și de frecvența redusă a purtătorilor sănătoși de Pseudomonas aeruginosa. Este o bacterie ce nu poate supraviețui prea mult în mediul uscat, fiind prin excelență acvatică, ce poate să se multiplice chiar în prezența unor cantități mici de hrană și are o capacitate destul de mare de rezistență la dezinfectante.

Specia Pseudomonas aeruginosa face parte din familia Pseudomonadaceae (grupul speciilor fluorescente), cuprinde bacili gram negativi nesporulați care sintetizează doi pigmenți caracteristici, piocianina și fluoresceina, sînt oxidazo-pozitivi, reduc nitrații în nitriți, lichefiază gelatina, oxidează glucoza, reduc acetamidele amoniac și sînt rezistente la compuși cuaternari de amoniac (Cetrimid).

În condiții deficitare de igienă, specia Pseudomonas aeruginosa este frecvent izolată din mediul spitalicesc unde poate genera infecții intraspitalicești ; Pseudomonas aeruginosa reprezintă principala bacterie condiționat patogenă ce determină infecții grave la indivizi cu deficit imunitar.

I s-a semnalat constant prezența în apele uzate menajere și efluenții stațiilor de epurare. În apa reziduală se găsește în general în prezența coliformilor, dar au existat situații cînd a fost izolată din apa potabilă, chiar în absența coliformilor fecali, probabil datorită anumitor materiale sau deficiențe de construcție ale rețelei de distribuție care îi favorizează creșterea. Deși s-a preconizat utilizarea anumitor microorganisme pentru a evalua calitatea igienică a apei potabile, totuși nici decelarea calitativă și nici determinarea cantitativă a speciei Pseudomonas aeruginosa nu constituie un element esențial al supravegherii curente a calității igienice a apei potabile. Determinarea prezenței acestei bacterii în apa potabilă nu trebuie să se utilizeze pentru cercetarea curentă a poluării fecale.



Scanned with OKEN Scanner

Cercetarea speciei Pseudomonas aeruginosa prezintă interes în anumite împrejurări, dînd o idee asupra caracteristicilor generale ale rețelei, precum și în situații ca : prepararea în spital a amestecurilor de rehidratare, a alimentelor pentru nou-născuți și produselor farmaceutice, pentru supravegherea aprovizionării cu apă a spitalelor etc. De asemenea, cercetarea speciei Pseudomonas aeruginosa prezintă interes pentru aprecierea calității din punct de vedere igienic a apelor plate și minerale livrate îmbuteliate, deoarece în timpul îmbutelierii și comercializării apei minerale naturale trebuie să fie de o asemenea calitate, încît să nu prezinte risc pentru sănătatea consumatorului (propunerea Comunității Economice Europene).

În ultimul timp se dezbate în literatura de specialitate rolul acestei specii și ca indicator de calitate a apelor folosite în scopuri recreaționale. Este o consecință firească a faptului că autoritățile sanitare trebuie să țină seama de metodele noi elaborate pentru izolarea microorganismelor din mediu ce prezintă un potențial de risc pentru sănătate, ceea ce a dus la includerea pe lîngă indicatorii bacterieni de origine fecali și a patogenilor oportuniști responsabili de infecțiile nazofaringiene, otice, oculare, cutanate asociate cu folosința apei de piscină. În majoritatea țărilor s-au elaborat standarde pentru supravegherea calității apelor de piscină, care au introdus ca indicator de apreciere a calității igienice a apei decelarea speciei Pseudomonas aeruginosa.

Cercetarea bacteriilor patogene din apă se poate face, în scop epidemiologic, pentru stabilirea rolului unei ape în apariția unor cazuri de îmbolnăviri cu caracter hidric, în scop sanitar pentru caracterizarea sanitară a apelor unui bazin natural, sau pentru stabilirea prezenței unor surse de poluare care contaminează apa unui rîu sau a unei fîntîni.

Dintre enterobacteriile patogene care pot să contamineze sursele de apă, genul Salmonella datorită celor peste 2 000 serotipuri patogene pentru om și animal, este considerat cel mai reprezentativ ca element de contaminare posibilă a apei cu enterobacterii patogene. Decelarea genului Salmonella oferă informații utile atunci cînd se alege amplasarea sorbului unei instalații centrale de aprovizionare cu apă din surse de apă de suprafață, atunci cînd se constituie surse suplimentare de poluare fecală a apei de suprafață care servește la aprovizionarea cu apă a unor instalații centrale în funcțiune și în sfîrșit, cînd constituie informații de ordin epidemiologic ce indică creșterea frecvenței îmbolnăvirilor enterice într-un teritoriu deservit de o instalație centrală de aprovizionare cu apă din surse de suprafață.

### 2.3.7. **Norme sanitare**

În funcție de utilizarea ei, apa trebuie să îndeplinească o serie de condiții de calitate.

În acest scop, în condițiile țării noastre, s-au elaborat standardele de stat : STAS 1342/84 apa potabilă, STAS 12585/87 apa din bazinele de înot din zone naturale amenajate pentru înot și STAS 9450/88 apa pentru irigarea culturilor agricole.



Scanned with OKEN Scanner

STAS 1342/84 cuprinde condițiile de calitate pe care trebuie să le îndeplinească o apă pentru a fi folosită în scop potabil. Ea trebuie să aibă anumite proprietăți organoleptice, fizice, chimice, radioactive, bacteriologice și biologice. Indicatorii bacteriologici sanitari propuși și analizați prin metodele de analiză curentă conform STAS nr. 3101/83 trebuie să se încadreze în anumite limite. Aceste limite s-au stabilit în funcție de categoria de apă folosită ca sursă de aprovizionare cu apă, cît și de sistemul de instalație și de mărimea colectivității care este aprovizionată de această instalație (tabelul nr. IV).

*Tabel nr. IV*

**Condiții de calitate pentru apa potabilă** (STAS 1342/84)

| *Felul apei potabile* | *Numărul total de bacterii care se dezvoltă la 37°C/cm³* | *Numărul probabil de bacterii coliforme totale/ dm³* | *Numărul probabil de bacterii coliforme fecale/ dm³* |
|---|---|---|---|
| Apă furnizată de instalații centrale ale orașului București | | | |
| — punct de intrare în rețea | sub 20 | sub 3 | sub 3 |
| — punct din rețeaua de distribuție | sub 20 | sub 3* | sub 3 |
| Apa furnizată de instalațiile centrale urbane, rurale, cu apă dezinfectată: | | | |
| — punct de intrare rețea | sub 100 | sub 10 | sub 10 |
| — punct din rețeaua de distribuție | sub 100 | sub 10** | sub 10 |
| Apă furnizată de instalațiile centrale urbane, rurale cu apă nedezinfectată: | | | |
| — punct de intrare în rețea | sub 100 | sub 30 | sub 10 |
| — punct din rețeaua de distribuție | sub 100 | sub 30** | sub 10 |
| Apă furnizată din surse locale (fîntîni, izvoare etc.). | sub 300 | sub 100 | sub 20 |

* pentru maximum 5% din probe se admite sub 10/dm³
** pentru maximum 5% din probe se admite sub 100 dm³.

Acești indicatori bacteriologici pot fi completați în situații speciale (alegerea unei surse noi de apă, epidemii hidrice, poluări accidentale, surse și stații de tratare și dezinfectare a apei potabile, rețele de distribuție deficitare, controlul calității dezinfecției etc. și cu alți indicatori bacteriologici ca : bacterii aerobe care se dezvoltă la 22°C (număr total/ cm³), streptococi fecali (număr probabil/dm³), bacteriofagi antitifici și anticoli (număr probabil/dm³), pentru care metodele de analiză bacteriologică sînt stabilite în STAS 3001/83.



Scanned with OKEN Scanner

Deși pentru acești indicatori nu sînt stabilite limite, prezența streptococilor fecali, a bacteriofagilor antitifici și anticoli, sau modificarea raportului normal de 3 : 1 a bacteriilor care se dezvoltă la 22°C în favoarea florei mezofile, indică poluarea fecală a apei potabile cu constituirea unui potențial de risc pentru sănătatea colectivităților.

STAS 12585/87 cuprinde condițiile de calitate pentru apa din bazinele de înot și apa din zone naturale amenajate pentru înot pe rîuri, lacuri, Marea Neagră, dar nu se referă la apele terapeutice și la apele cu salinitate ridicată din bazinele de înot sau din lacuri (tabelul nr. V).

Indicatorii bacteriologici propuși și limitele de încadrare pentru apa din bazine de înot sînt următoarele :

*Tabel nr. V*

**Condiții de calitate pentru apa din bazinele de înot** (STAS 12 585/87)

| | |
|---|---|
| Bacterii care se dezvoltă la 37°C, număr total/cm³ | sub 300 |
| Bacterii coliforme totale număr probabil/dm³ | sub 100 |
| Bacterii coliforme fecale număr probabil/dm³ | sub 20 |
| Enterobacterii patogene număr/dm³ | absente |

Indicatorii bacteriologici propuși și limitele de încadrare pentru apa din zone naturale amenajate pentru înot sînt cuprinse în tabelul nr. VI.

*Tabel nr. VI*

**Indicatorii bacteriologici propuși și limitele de încadrare pentru apa din zone naturale amenajate pentru înot sînt :**

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme totale număr probabil/dm³, maxim | 10 000 |
| Bacterii coliforme fecale număr probabil/dm³, maxim | 1 000 |
| Streptococi fecali, număr probabil/dm³, maxim | 200 |
| Germeni patogeni/dm³ | absent |

STAS 9450/88 — Apă pentru irigarea culturilor agricole presupune o serie de noi indicatori microbiologici de apreciere a calității apei și folosirea diferențiată în raport cu tipul de cultură. În funcție de indicatorii microbiologici, apa pentru irigarea culturilor agricole se clasifică în trei categorii :

— categoria $M_1$ utilizabilă pentru toate solurile și plantele ;

— categoria $M_2$ utilizabilă pentru toate solurile și plantele cu excepția solurilor foarte permeabile și a plantelor cu destinație alimentară și furajeră în stare proaspătă sau conservată prin congelare, murare, fără prelucrare termică ;

— categoria $M_3$ utilizabilă numai pe terenurile cu nivelul freatic situat la mai mult de 4 m adîncime și pentru culturile ale căror produse sînt prelucrate termic industrial, precum și pentru produsele vegetale nealimentare.

Indicatorii microbiologici propuși și limitele de încadrare pentru cele trei categorii sînt cuprinse în tabelul nr. VII.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. VII*

| Denumirea indicatorului | Categoria | | |
|---|---|---|---|
| | $M_1$ | $M_2$ | $M_3$ |
| Bacterii coliforme totale, număr probabil/dm³ | max. 100 | peste 100 ... 100 000 | peste 100 000 ... 10 000 000 |
| Bacterii coliforme fecale, număr probabil/dm³ | absent | max. 10 000 | peste 10 000 ... 1 000 000 |
| Stafilococi fecali, număr probabil/dm³ | absent | max. 10 000 | peste 10 000 ... 1 000 000 |
| Bacterii din genul Salmonella | absent/1 000 cm³ | absent/300 cm³ | absent/100 cm³ |

## 2.4. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A APEI

### 2.4.1. Recoltarea, transportul și păstrarea probelor de apă

În vederea efectuării unei analize microbiologice, probele de apă se recoltează și se transportă cu anumite precauții. Cantitatea de apă necesară variază de la 500 cm³, pentru analizele curente, pînă la 100 dm³ pentru analize speciale.

Frecvența recoltării probelor este condiționată de sistemul de instalație și de mărimea colectivității care este aprovizionată de această instalație (STAS 1342/84).

Sterilizarea flacoanelor se face după ce au fost spălate, limpezite și uscate. Partea superioară a flaconului închis cu dopul de sticlă se înfășoară cu un capac de hîrtie care se leagă cu sfoară de gîtul flaconului, după ce între dop și gîtul flaconului se interpune o fîșie îngustă de hîrtie. Sterilizarea se face în etuvă la căldură uscată, la 180°C, timp de 1 oră, sau în autoclav la 121°C timp de 20 minute. În cazul recoltării apei din bazine rezervoare și fîntîni, flaconul de sticlă pregătit ca mai sus și legat cu o sfoară se sterilizează împreună cu suportul metalic în care este montat, amîndouă fiind împachetate în hîrtie.

**RECOLTAREA APEI**

— *Din instalații centrale*

Proba de apă de suprafață sau subterană tratată sau dezinfectată se recoltează de la robinete montate în puncte reprezentative fiecărei trepte de tratare.

Pentru recoltarea acestor probe, inclusiv a acelora din rețeaua de distribuție, se deschide robinetul și se lasă să curgă apa 5—10 minute. Se închide robinetul și se flambează. Se deschide din nou robinetul și se reglează debitul în așa fel încît să se formeze o coloană de apă continuă



Scanned with OKEN Scanner

de maximum 1 cm diametru. Se scoate dopul flaconului împreună cu capacul de hîrtie. Flaconul ținut cu mîna de partea lui inferioară se așază drept sub coloana de apă și se umple pînă la aproximativ 1 cm sub dop. Se astupă cu dopul, se pune capacul de hîrtie care se leagă din nou cu sfoară, apoi se notează.

Cînd nu există posibilitatea recoltării apei de la robinet, flaconul, împreună cu suportul metalic, sterilizate, se scot din hîrtie, se scoate dopul împreună cu capacul de hîrtie și ținut de sfoară, se introduce în bazin sau rezervor, unde se umple pînă la 1 cm sub dop, se astupă cu dopul și capacul de hîrtie care se leagă cu sfoara, apoi se notează.

În cazul cînd apa de analizat este colorată, înainte de sterilizarea flaconului pentru recoltarea probei, se introduce în flacon 1 $cm^3$ soluție 0,5% de tiosulfat de sodiu pentru 100 $cm^3$ probă de apă ce urmează a fi recoltată.

— *Din sursele locale (fîntîni, izvoare)*

Proba de apă de fîntînă se recoltează direct din apa fîntînii cu flaconul sau prin turnare din găleata fîntînii în flacon.

Pentru izolarea și identificarea enterobacteriilor patogene se recomandă recoltarea unor volume mari de apă, datorită faptului ca aceste bacterii patogene pentru om și animale sînt răspîndite inegal sub influența mișcărilor apei de suprafață și sînt supuse acțiunii rapide a factorului de diluție.

Pentru prelucrarea mai ușoară a acestor volume mari de apă, se recomandă concentrarea lor în volume mici folosindu-se în acest scop : fie filtrarea unui volum de 100 $dm^3$ prin perniță de tifon tip Moor (recomandată de Institutul de Igienă și Sănătate Publică București), fie filtrarea unor volume cunoscute, mai mici (1—5 $dm^3$) prin membrane filtrante, fie prin intermediul unui tampon de tifon tip Mocre care se scufundă la locul recoltei timp de 24—48 ore.

În timpul recoltării probelor de apă, se va evita orice posibilitate de contaminare accidentală a apei.

## NOTAREA PROBELOR

Flacoanele cu probele de apă se prevăd cu etichete pe care se înscriu datele necesare identificării probei :

— numărul probei sau lotului ;

— denumirea punctului de recoltare ;

— data și ora recoltării și eventuale caracteristici ale locului de recoltare ;

## TRANSPORTUL ȘI PĂSTRAREA PROBELOR

Probele se transportă la laborator, cît mai repede posibil (maximum 6 ore) după efectuarea recoltării. Transportul se face în lăzi compartimentate, refrigerate sau cu agenți frigorifici. În funcție de distanță, în special în anotimpul cald, probele se transportă mai ușor, în genți frigorifice, astfel ca temperatura să nu depășească +4°C. Dacă probele de apă recoltate nu pot fi aduse în laborator în timp util, datorită unor distanțe prea mari care trebuie parcurse, se păstrează la frigider maximum 24 ore.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.2. Determinarea numărului total de bacterii aerobe (UFC)* ce se dezvoltă la 22°C și 37°C

Metoda folosită este metoda incorporării în placă.

### ÎNSĂMÎNȚAREA

Din proba de apă de analizat, bine omogenizată prin mișcări rotatorii ale flaconului în plan orizontal în ambele sensuri, se ia cu o pipetă sterilă de 2 $cm^3$ sau 1 $cm^3$, cîte un volum de 1 $cm^3$ și se introduce în două cutii Petri.

În cazul probelor de apă de fîntînă sau al apelor cu un număr mai mare de bacterii este necesară să se însămînțeze și proba diluată la $10^{-1}$, $10^{-2}$ etc., în funcție de nivelul de contaminare presupus.

În fiecare cutie Petri cu proba nediluată sau diluată se introduc 10—15 $cm^3$ mediu geloză nutritivă topită și răcită la 45°C. Se omogenizează conținutul cutiilor Petri prin mișcări de rotație în plan orizontal, în ambele sensuri, după care se lasă să se solidifice geloza. Pe capacele cutiilor Petri se notează numărul probei, diluția, data însămînțării și temperatura de incubare.

### EFECTUAREA DILUȚIILOR

Într-o eprubetă care conține 9 $cm^3$ soluție de lucru apă tamponată sterilă sau ser fiziologic, se introduce 1 $cm^3$ probă de apă cu pipeta de 1 $cm^3$ și se omogenizează conținutul. Se obține astfel diluția $10^{-1}$. Cu aceeași pipetă cu care s-a omogenizat și s-a pus cîte 1 $cm^3$ apă în cele două plăci, se trece 1 $cm^3$ din diluția $10^{-1}$, într-o altă eprubetă care conțin 9 $cm^3$ soluție de lucru. Cu o altă pipetă se omogenizează conținutul, realizîndu-se astfel diluția $10^{-2}$. Așa se procedează mai departe pentru obținerea unor diluții mai mari.

### ÎNCUBAREA

Cutiile Petri însămînțate în dublu, se introduc cu capacul în jos la termostat, după solidificarea gelozei, jumătate din plăci la termostatul de 37°C, iar cealaltă jumătate la termostatul de 22°C. Incubarea durează 48 h.

### STABILIREA NUMĂRULUI TOTAL DE BACTERII (UFC)

Se numără coloniile (UFC) care s-au dezvoltat, atît la suprafață cît și în interiorul gelozei, cu ochiul liber sau cu lupa. Plăcile care conțin peste 300 colonii (UFC), nu se iau în considerare și se elimină. Se trece la numărarea coloniilor (UFC) de la diluțiile însămînțate, ce conțin sub 300 colonii (UFC).

---

* UFC — unități formatoare de colonii.



Scanned with OKEN Scanner

Cînd nu se folosesc diluții, rezultatul se exprimă prin numărul coloniilor (UFC) care s-au dezvoltat raportîndu-se la volumul de apă 1 $cm^3$ care a fost însămînțat din proba ca atare.

Dacă s-au folosit diluții, calculul numărului total de bacterii raportat la 1 $cm^3$ apă ca atare, se realizează folosind formula :

$$\frac{(n \cdot d)}{N} = \text{numărul total de bacterii pe } cm^3 \text{ (UFC/}cm^3\text{)}$$

în care :

n = numărul total de colonii (UFC) ce s-au dezvoltat pe o cutie Petri ;

d = inversul diluției probei însămînțate ;

N = numărul de cutii Petri luate în calcul.

### 2.4.3. Determinarea cantitativă a coliformilor totali și fecali

Determinarea prezenței și numărului de coliformi totali și fecali se face obligatoriu în scopul aprecierii calității apei din punct de vedere bacteriologic. Determinarea se face conform STAS 3001/83 prin două metode :

— metoda tuburilor multiple (care furnizează date de evaluare a celui mai probabil număr) ;

— metoda membranelor filtrante (metodă cantitativă de numărare a coloniilor).

#### 2.4.3.1. Metoda tuburilor multiple

Metoda tuburilor multiple este o metodă în care examinarea apei începe printr-o probă de prezumție ce constă din însămînțarea unor volume determinate de apă în flacoane cu medii de cultură lichide pe bază de lactoză. După incubarea la 37°C un anumit timp se cercetează formarea acidului și gazului, rezultate din fermentarea lactozei. Se vorbește de probă de prezumție, pentru că reacția pozitivă observată poate să rezulte și de la alte microorganisme sau combinații de microorganisme. Apariția de reacții fals pozitive depinde atît de flora bacteriană a probelor de apă analizate, cît și de mediul de cultură utilizat. Pentru a se confirma prezența grupului coliformilor trebuie să se procedeze la teste suplimentare cu ajutorul unui alt mediu de cultură selectiv.

Prin urmare, însămînțînd un anumit număr de tuburi cu volume de apă apropiate și bazat pe ipoteza că incubarea va fi urmată de creșterea în fiecare tub care a primit unul sau mai mulți coliformi viabili, se poate obține o estimare statistică a numărului cel mai probabil (MPN) de coliformi conținuți într-un volum de apă stabilit.

Este o metodă aplicabilă la toate felurile de apă, iar echipamentul necesar este relativ ieftin și puțin specializat.



Scanned with OKEN Scanner

Reacțiile pozitive se citesc în în general ușor și se interpretează rapid. Această tehnică nu furnizează totuși decît o estimare a numărului de coliformi conținuți în apă și această estimare este uneori subiect de erori, ceea ce nu împiedică metoda să detecteze o eventuală poluare a apei. Totodată, utilizîndu-se medii de cultură lichide trebuie ca din acestea să se facă subculturi pe medii solide pentru a obține culturi pure înainte de a se proceda la diferențierea coliformilor de alte microorganisme.

**TESTUL DE PREZUMȚIE**

— Pentru apa din instalațiile centrale (rezervoare și rețea de distribuție) din orașul București, se ia în lucru un volum de 300 $cm^3$ apă pentru analiză, din care se însămînțează cîte 100 $cm^3$ apă în două flacoane care conțin fiecare cîte 100 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey)* dublu concentrat și cîte 10 $cm^3$ apă în 10 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey) dublu concentrat.

— Pentru apa din alte instalații centrale (rezervor și rețea de distribuție) se ia în lucru un volum de 100 $cm^3$ apă pentru analiză din care se însămînțează 50 $cm^3$ apă într-un flacon care conține bulion bilă lactoză (McConkey) dublu concentrat și cîte 10 $cm^3$ apă în cîte 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey) dublu concentrat.

— Pentru apa din surse locale (fîntîni, izvoare) se ia în lucru un volum de 55,5 $cm^3$ apă pentru analiză din care se însămînțează cîte 10 $cm^3$ apă în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey) dublu concentrat, cîte 1 $cm^3$ apă în 5 eprubete care conțin cîte 10 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey) și cîte 1 $cm^3$ apă diluată 1/10 în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion bilă lactoză (McConkey). Cînd apa este poluată sau nu se cunoaște gradul de poluare, se va însămînța în continuare în același mod din diluțiile următoare : 1/100, 1/1 000, 1/10 000. Flacoanele și eprubetele însămînțate se introduc în termostat și se incubează la 37°C timp de 48 h.

Testul evidențiază faptul că grupul coliformilor fermentează lactoza în bulion McConkey, cu producere de acid (prin virarea culorii mediului în galben) și gaz (prin prezența în tuburile de fermentare Durham), sau numai de gaz în cazul folosirii bulionului lauryl sulfat.

După 24 h. incubare se face o primă citire și efectuare a testului de confirmare pentru flacoanele sau eprubetele pozitive, considerîndu-se pozitive probele în care se evidențiază fermentarea lactozei prin prezența de gaz, oricît de mică ar fi cantitatea de gaz degajată. La 48 ore se face citirea definitivă și trecerile pentru testul de confirmare din toate flacoanele și eprubetele pozitive, cu excepția celor ce s-au confirmat la 24 ore.

**TESTUL DE CONFIRMARE**

Pentru a preciza dacă germenii care au fermentat lactoza sînt coliformi și nu alte specii microbiene dotate cu aceleași proprietăți (lactobacili, ciuperci), din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive la tes-

* — mediul McConkey poate fi înlocuit cu bulion lauryl sulfat.



Scanned with OKEN Scanner

tul prezumtiv, se fac însămînțări cu ansa în prelabil flambată, pe mediul geloză lactoză eozină albastru de metilen (Levine). Folosind tehnica epuizării ansei, se fac dispersii în striuri pe sectoare, pentru a obține colonii izolate (pe o placă Petri cel mult 5 sau 6 sectoare pentru trecerile din eprubete și 2 sau 4 sectoare pentru trecerile din flacoane). Se incubează plăcile Petri în termostat la 37°C timp de 24 h. Prezența coliformilor se confirmă dacă s-au dezvoltat colonii caracteristice : colonii plate de culoare albastru-violet închis cu luciu metalic, sau bombate, opace, mucoase cu luciu metalic în centru, sau de culoare roz cu centrul albastru-violet.

Referitor la mediile utilizate în metoda tuburilor multiple — testul de prezumție, prezența sărurilor biliare în bulionul McConkey inhibă creșterea organismelor gram pozitive. Ca o alternativă a sărurilor biliare se pot folosi cu rol inhibitor Teepol.

O altă alternativă a bulionului McConkey în testul prezumtiv este mediul îmbunătățit format — lactoză-glutamat — care ca mediu de îmbogățire s-a dovedit cel mai bun pentru numărarea grupului coliformilor. Totuși cîțiva germeni sporulați aerobi pot cauza false reacții prezumtive în acest mediu. Pentru inhibarea gram pozitivilor lactozofermentativi, incluzînd bacteriile sporulate aerobe și anaerobe, de asemenea este utilizat cu bune rezultate testul prezumtiv lauryl sulfatul. Acest agent inhibă organismele interferente la concentrații de 0,1‰ și permite o bună creștere a grupului coliformilor.

## STABILIREA NUMĂRULUI PROBABIL DE COLIFORMI TOTALI (MPN)

Determinarea numărului probabil de coliformi la decimetru cub se face cu ajutorul tabelelor de probabilitate 1, 2, 3 McCrady, în funcție de cantitatea de apă analizată luîndu-se în considerare flacoanele și eprubetele confirmate.

Combinațiile variate ale rezultatelor pozitive și negative permit să fie estimat numărul probabil de coliformi totali.

— Calculul numărului probabil de coliformi totali pe $dm^3$ apă din instalațiile centrale din orașul București se face cu ajutorul tabelului nr. VIII.

— Calculul umărului probabil de coliformi totali pe $dm^3$ apă din alte instalații centrale se face cu ajutorul tabloului nr. IX.

— Calculul numărului probabil de coliformi pe $dm^3$ apă din surse locale se face cu ajutorul tabelului nr. X.

Cînd s-au însămînțat mai mult de 3 diluții de apă pentru citirea tabelului nr. X se vor lua în considerare numai o serie de 3 diluții situate la limita pozitivității și anume se va alege ultima serie de diluții total sau parțial pozitivă (precedată de serii total pozitive) și cele două serii de diluții următoare. Numărul probabil de coliformi totali pe decimetru cub se obține prin adăugarea unui număr de zerouri egal cu diferența între prima cantitate luată în calcul și prima cantitate citită în tabel (10 $cm^3$).



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. VIII*

| Numărul eprubetelor pozitive din : | | Numărul probabil de germeni coliformi/dm³ probă de apă | Numărul eprubetelor pozitive din : | | Numărul probabil de germeni coliformi/dm³ probă de apă |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 eprubete fiecare conținînd 100 cm³ probă de apă | 10 eprubete fiecare conținînd 10 cm³ probă de apă | | 2 eprubete fiecare conținînd 100 cm³ probă de apă | 10 eprubete fiecare conținînd 10 cm³ probă de apă | |
| 0 | 0 | sub 3 | 1 | 6 | 36 |
| 0 | 1 | 3 | 1 | 7 | 43 |
| 0 | 2 | 7 | 1 | 8 | 51 |
| 0 | 3 | 11 | 1 | 9 | 60 |
| 0 | 4 | 14 | 1 | 10 | 69 |
| 0 | 5 | 18 | 2 | 0 | 11 |
| 0 | 6 | 22 | 2 | 1 | 18 |
| 0 | 7 | 27 | 2 | 2 | 27 |
| 0 | 8 | 31 | 2 | 3 | 38 |
| 0 | 9 | 36 | 2 | 4 | 52 |
| 0 | 10 | 40 | 2 | 5 | 70 |
| 1 | 0 | 4 | 2 | 6 | 92 |
| 1 | 1 | 8 | 2 | 7 | 120 |
| 1 | 2 | 13 | 2 | 8 | 164 |
| 1 | 3 | 18 | 2 | 9 | 230 |
| 1 | 4 | 21 | 2 | 10 | peste 230 |
| 1 | 5 | 30 | — | — | — |

*Tabel nr. IX*

| Numărul eprubetelor pozitive din : | | Numărul probabil de germeni coliformi/dm³ probă de apă |
|---|---|---|
| 1 eprubetă conținînd 50 cm³ probă de apă | 5 eprubete fiecare conținînd 10 cm³ probă de apă | |
| 0 | 0 | sub 10 |
| 0 | 1 | 10 |
| 0 | 2 | 20 |
| 0 | 3 | 40 |
| 0 | 4 | 50 |
| 0 | 5 | 70 |
| 1 | 0 | 20 |
| 1 | 1 | 30 |
| 1 | 2 | 60 |
| 1 | 3 | 90 |
| 1 | 1 | 160 |
| 1 | 5 | peste 160 |



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. X*

**Calculul numărului probabil de germeni coliformi/dm³ de apă din instalațiile individuale se face cu ajutorul tabelului X.**

Cantitățile de apă însămînțate: 5 volume de 10 cm³, 5 volume de 1 cm³ și 5 volume de 0,1 cm³

| *Numărul eprubetelor pozitive din:* | | | *Numărul probabil de germeni coliformi/dm³ probă de apă* | *Numărul eprubetelor pozitive din:* | | | *Numărul probabil de germeni coliformi/dm³ probă de apă* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *5 eprubete fiecare conținînd 10 cm³ probă de apă* | *5 eprubete fiecare conținînd 1 cm³ probă de apă* | *5 eprubete fiecare conținînd 0,1 cm³ probă de apă* | | *5 eprubete fiecare conținînd 10 cm³ probă de apă* | *5 eprubete fiecare conținînd 1 cm³ probă de apă* | *5 eprubete fiecare conținînd 0,1 cm³ probă de apă* | |
| 0 | 0 | 0 | sub 20 | 4 | 2 | 1 | 260 |
| 0 | 0 | | 20 | 4 | 3 | 0 | 270 |
| 0 | 1 | 0 | 20 | 4 | 3 | 1 | 330 |
| 0 | 2 | 0 | 40 | 4 | 4 | 0 | 340 |
| 1 | 0 | 0 | 20 | 5 | 0 | 0 | 230 |
| 1 | 0 | 1 | 40 | 5 | 0 | 1 | 310 |
| 1 | 1 | 0 | 40 | 5 | 0 | 2 | 430 |
| 1 | 1 | 1 | 60 | 5 | 1 | 0 | 330 |
| 1 | 2 | 0 | 60 | 5 | 1 | 1 | 460 |
| 2 | 0 | 0 | 50 | 5 | 1 | 2 | 630 |
| 2 | 0 | 1 | 70 | 5 | 2 | 0 | 400 |
| 2 | 1 | 0 | 70 | 5 | 2 | 1 | 700 |
| 2 | 1 | 1 | 90 | 5 | 2 | 2 | 940 |
| 2 | 2 | 0 | 90 | 5 | 3 | 0 | 790 |
| 2 | 3 | 0 | 120 | 5 | 3 | 1 | 1 000 |
| 3 | 0 | 0 | 80 | 5 | 3 | 2 | 1 410 |
| 3 | 0 | 1 | 110 | 5 | 3 | 3 | 1 750 |
| 3 | 1 | 0 | 110 | 5 | 4 | 0 | 1 300 |
| 3 | 1 | 1 | 140 | 5 | 4 | 1 | 1 730 |
| 3 | 2 | 0 | 140 | 5 | 4 | 2 | 2 210 |
| 3 | 2 | 1 | 170 | 5 | 4 | 3 | 2 780 |
| 3 | 3 | 0 | 170 | 5 | 4 | 4 | 3 450 |
| 4 | 0 | 0 | 130 | 5 | 5 | 0 | 2 400 |
| 4 | 0 | 1 | 170 | 5 | 5 | 1 | 3 480 |
| 4 | 1 | 0 | 170 | 5 | 5 | 2 | 5 120 |
| 4 | 1 | 1 | 210 | 5 | 5 | 3 | 9 180 |
| 4 | 1 | 2 | 260 | 5 | 5 | 4 | 16 090 |
| 4 | 2 | 0 | 220 | 5 | 5 | 5 peste | 16 090 |

Dacă se obțin rezultate care nu se încadrează în tabelul X (acestea fiind însă puțin probabile), trebuie repetată determinarea folosind diluții mai mari.

În cazul cînd s-au însămînțat mai mult de 3 diluții pentru citirea tabelului se vor lua în considerație numai un grup de trei serii de diluții zecimale; anume se va alege ultima serie de diluție total sau parțial pozitivă (precedată de serii total pozitive) și cele două serii de diluții următoare; iar numărul probabil de germeni coliformi/dm³ se obține prin adăugarea unui număr de zerouri egal cu diferența dintre prima diluție luată în calcul și prima cantitate citită din tabel (10 cm³).



Scanned with OKEN Scanner

## DETERMINAREA COLIFORMILOR FECALI

Pentru a determina dacă coliformii care au fost detectați în testul prezumtiv ca posibil coliformi fecali, sînt confirmați, trebuie să fie aplicate teste suplimentare diferențiale. Unul din teste care se aplică invariabil este testul Eijkman. Aceasta depinde de capacitatea E. coli biotip I de a produce acid și gaz cînd crește în mediul bulion bilă lactoză (McCondey) la 44±0,5°. Pentru aceasta din fiecare flacon sau eprubetă în care la testul prezumtiv s-a constatat prezența de acid și gaz după 24—48 h se trece cu o pipetă Pasteur un inocul de 3—4 picături în cîte o eprubetă cu mediu bulion bilă lactoză (McConkey)*. Eprubetele sînt apoi incubate la 44±0,5° timp de 24 h. Virarea culorii mediului în galben (acidificare) concomitent cu formarea de gaz, indică prezența coliformilor fecali și astfel poate fi făcută o estimare a numărului probabil (MPN) de coliformi fecali la $dm^3$. Saprofiții care pot exista în probele de apă și care dau acid și gaz la 37°C nu pot să crească la 44±0,5°.

Referitor la mediile folosite pentru determinarea coliformilor fecali, un mediu alternativ pentru utilizarea în testul Eijkman este bulionul bilă verde briliant (BBLV). Prezența verdelui biliant inhibă creșterea fermentatorilor anaerobi ai lactozei, ca de exemplu, Clostridium perfiringens, care ar putea da reacții false pozitive la 44±0,5°C. Este cunoscut, de asemenea, că bulionul lactoză ricinoleat dă mai bune rezultate ca bulionul bilă verde briliant. Producerea de gaz de către grupul coliformilor și E.coli în bulion lactoză lauryl sulfat (LTLB) a fost comparată cu aceea în bulion bilă verde briliant (BBLV). La o temperatură de incubare de 37°C amîndouă au fost satisfăcătoare, dar la 44±0,5° bulionul lauryl sulfat a dat false rezultate negative și a fost astfel mai puțin inhibant ca bulionul bilă verde briliant (BBLV).

S-a comparat și bulionul lactoză lauryl sulfat cu bulionul lauryl triptoză manitol (LTMB) un singur tub de confirmare la 44±0,5° și s-a arătat că LTMB special cu triptofan (0,1 g/l) adăugat mediului crește mult rezultatele pozitive și în multe cazuri reacția indolului este mai puternică.

## TESTUL DE IDENTIFICARE PENTRU ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli este neîndoielnic de origine fecală, dar ca și alți coliformi este larg răspîndit în natură, semnificația prezenței sale în apă fiind mult discutată. De asemenea, toți membrii grupului coliformilor, larg răspîndit în natură pot fi de origine fecală.

Procedura practică perfectă de distingere între E.coli și alți coliformi nu a fost încă descoperită. Conform definiției, identificarea E.coli ar necesita cultivarea în bulion lactozat la 37°C și 44±0,5° pentru detectarea producerii de acid și gaz, izolarea în cultură pură din tuburile pozitive și efectuarea pentru fiecare cultură suspectată ca fiind E.coli a : colorației Gram, testului oxidazei și a unor alte teste utilizate pentru diferențierea din grupul coliformilor, teste care completează seria IMVIC.

---

* — mediul McConkey poate fi înlocuit cu bulion lauryl sulfat



Scanned with OKEN Scanner

Primul test din seria IMVIC se bazează pe capacitatea E.coli de a elibera indolul din triptofan.

Din cultură pură obținută din eprubetele pozitive la 44±0,5° pe un mediu solid lactozat, ca agar albastru de brom timol lactoză (AABTL) se fac subculturi într-un bulion peptonat, iar după incubarea timp de 48 h la 37°C se adaugă 0,5 ml reactiv Kovac's pentru detectarea indolului liber. Dacă incubarea acestui test este realizată la 44±0,5° coliformii fecali tipici pot forma indol, în timp ce alte tipuri „neregulate nu pot realiza acest test.

Există tulpini de E.coli incapabile să fermenteze lactoza și să producă acid în 2 zile la 44±0,5°. De asemenea, tulpini de E.coli enteropatogen (EPEC) pot uneori să fermenteze tardiv sau de loc lactoza. S-a demonstrat că doar 90% din tulpinlie de E.coli produc acid din lactoză în timp de două zile, pe cînd 99% din totalul tulpinilor produc indol. Ca urmare, capacitatea de a produce indol la 44±0,5° a fost folosită pentru punerea la punct a unei metode directe de detectare și numărare a E.coli în apă sau alimente. În acest scop, mediul lactoză triptonă ricinoleat poate fi utilizat la 44±0,5° pentru detectarea E.coli în 24 h.

Un al doilea test aplicat — reacția roșu metil — se bazează pe însămînțarea din cultura pură într-un bulion glucozat tamponat. Cantitatea de acid produsă cînd coliformii fermentează glucoza, variază și acest bulion este înalt tamponat cu dipotasium hidrogen fosfat la pH = 7.5. Dacă prin fermentarea glucozei rezultă suficient acid, capacitatea de tamponare a mediului este învinsă și pH-ul scade sub 4,6. Acest lucru se poate detecta prin adăugarea de cîteva picături de soluție roșu metil în eprubetele ce au fost incubate pentru 48 h la 37°C și un rezultat pozitiv este dat pentru E.coli de culoarea roșie intensă.

Cultura în bulion glucozat poate fi, de asemenea, utilizată pentru testul Voges-Proskauer în care bacteriile fermentează carbohidrații cu producere de acetilmetilcarbinol. La cultura în bulion glucozat se adaugă 1 ml soluție 40% hidroxid de potasiu și 3 ml soluție 5% de α — naftol în etanol. O reacție pozitivă este indicată de apariția unei culori roz în 2—3 minute care devine roșu închisă în 30 minute. Ca o alternativă a α —naftolului care este cancerigen se poate utiliza reactivul O'Meara.

Testul final este reprezentat de examinarea capacității E.coli de a utiliza citratul ca unică sursă de carbon. Mediul utilizat poate fi mediul lichid Koser sau agar citratul Simmons. Citratul poate fi utilizat de coliformi (Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter), ca unică sursă de carbon, dar nu poate fi utilizat ca unică sursă de carbon de E.coli de origine fecală. Rezultatele obținute pe mediul Koser vor fi interpretate în felul următor : creștere (turbiditate) — reacție poztivă și necreștere — reacție negativă. Rezultatele obținute pe mediul Simmons în felul următor : creștere și colorație albastră a mediului reacție pozitivă, necreșterea și culoarea originală verde a mediului, reacție negativă.

Deci prin utilizarea testelor IMVIC poate fi făcută distincția coliformilor, din cultura pură (izolată din tuburile de fermentare confirmate) și interpretarea rezultatelor conform clasificării Parr a coliformilor fecali. Această procedură include astfel tulpini în plus față de E.coli și este numită „test coliform-fecal". (tabelul nr. XI).



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XI*

**Interpretarea Parr a reacțiilor IMVIC**

| *originea bacteriilor* | *bacteria din genul* | *I* | *M* | *V* | *C* |
|---|---|---|---|---|---|
| fecală | Escherichia coli | +<br>+<br>− | +<br>−<br>+ | −<br>−<br>− | −<br>−<br>− |
| sol | Enterobacter-Klebsiella | −<br>−<br>− | −<br>−<br>− | +<br>+<br>− | +<br>−<br>+ |
| grup intermediar | | Rămîn 10 combinații posibile | | | |

Clasificarea IMVIC trebuind să fie aplicată după cum s-a arătat doar la cultura pură a coliformilor, în general identificarea E.coli necesită aproape o săptămînă de muncă în laborator. Din acest motiv s-au făcut încercări de a modifica procedura fără pierderi semnificative în sensibilitate.

Metoda tuburilor multiple în care producerea de gaz reprezintă reacția pozitivă a fermentării lactozei este o astfel de metodă pentru coliformii fecali a cărei selectivitate este bazată într-o mare măsură pe evaluarea temperaturii de incubare de $44 \pm 0{,}5°$.

Este de menționat faptul că există totuși puncte de vedere diferite ; fie că testul prezumtiv pentru prezența coliformilor ar putea detecta Escherichia coli biotip I care produce acid, gaz din lactoză și indol la $44 \pm 0{,}5°$, fie că s-ar putea baza în mod unic pe formarea acidului și gazului din lactoză la $44 \pm 0{,}5°$. Acest ultim criteriu este baza testului nord-american care detectează E.coli tip I și neregulat tipurile II și VI ce nu sînt de origine fecală. Modul de abordare european are la bază recunoașterea microorganismelor presupuse coliforme fecale prin formarea de acid și gaz, precum și formarea de indol la $44 \pm 0{,}5°$, care exclude tipurile „neregulate" și detectează E.coli biotip I. (Tabel nr. XII).

Teste utilizate pentru coliformi fecali :

*Tabel nr. XII*

| | *Producere de indol la 44°* | *Gazul în BBLV la 44°* | *Testul Eijkman la 44°* |
|---|---|---|---|
| Coliformi fecali tipici | + | + | + |
| Tipuri intermediare de coliformi fecali | − | + | + |
| Alte microorganisme | + | − | − |
| | − | − | − |

Determinarea numărului probabil de coliformi fecali la decimetru cub se face cu ajutorul tabelelor de probabilitate McCardy ca și pentru coliformi totali, luîndu-se în considerare ca rezultat pozitiv formarea acidului și gazului din lactoză la $44 \pm 0{,}5°$ și producerea de indol la aceeași temperatură de $44 \pm 0{,}5°$.

### 2.4.3.2. Metoda membranei filtrante

Prin metoda membranei filtrante se determină numărul de coliformi prezenți în apă, filtrînd un volum determinat de apă printr-o membrană, în general confecționată din esteri celulozici. Coliformii prezenți în apă sînt reținuți pe suprafața membranei. Aceasta se plasează apoi cu fața în sus pe un mediu solid lactozat și se incubează. Toate coloniile care se dezvoltă fermentînd lactoza cu producere de acid sînt numărate fie ca și coliformi totali, fie ca și coliformi fecali, în funcție de temperatura de incubare : 37°, respectiv $44 \pm 0{,}5°$. Cum nu este posibil să se determine dacă există sau nu producere de gaz pe membrane, se admite că toate coloniile care produc acid, produc de asemenea și gaz.

De altfel, probele de confirmare aplicate ulterior au demonstrat formarea de gaz de către toate coloniile oxidazo-negative. După numărarea coloniilor, rezultatele se exprimă prin numărul de unități formatoare de colonii la decimetru cub probă de apă. În general, se pun două membrane la incubat pentru o probă, una la 37°, alta la $44 \pm 0{,}5°$. Metoda de confirmare este în acest caz mai simplă decît metoda tuburilor multiple, căci temperatura de incubare mai ridicată furnizează mai rapid o estimare directă a numărului de coliformi fecali, ceea ce permite luarea fără întîrziere a măsurilor de se impun. Metoda membranei filtrante se aplică conform STAS 3001/83 în următoarele cazuri : cînd trebuie determinat rapid conținutul de coliformi, pentru economie de timp și materiale, în cazul unui număr mare de probe, cînd transportul probelor pînă la laborator durează mult timp și este necesară însămînțarea probelor la locul de recoltare.

Metoda ridică însă anumite probleme. Deși ar putea fi utilizate teoretic pentru orice apă, o turbiditate mare duce la obturarea porilor membranei înainte ca o cantitate suficientă de apă să poată fi filtrată. La fel de inutilizabilă este metoda membranei, dacă proporția de coliformi este redusă față de cea a altor microorganisme a căror creștere poate să invadeze membrana în totalitate, ducînd la inhibarea creșterii coliformilor.

Modificări se pot aduce metodei în cazul germenilor cu metabolismul alterat, pentru că au fost expuse la metale grele sau dezinfectanți. O preincubare la temperaturi inferioare sau pe medii mai puțin selective, poate să amelioreze situația și să amorseze creșterea înainte de trecerea pe medii selective.



Scanned with OKEN Scanner

## APARATURĂ

— dispozitiv pentru filtrare compus dintr-un flacon de sticlă tip Kitasato pentru filtrarea sub presiune pe care se așază montura metalică a unui filtru tip Seitz. Întreg dispozitivul se sterilizează în prealabil ;

— pompă sau trompă de vid cu care se face legătura pentru accelerarea procesului de filtrare ;

— membrane filtrante cu diametrul de 47—50 mm și cu diametrul porilor de 0,4 μm, sterile.

## MOD DE LUCRU

Mărimea volumelor filtrate dintr-o probă de apă se apreciază în funcție de încărcătura apei. Astfel ca pe o membrană filtrantă să se obțină 25—1000 colonii caracteristice.

— Pentru probele de apă din instalațiile centrale (rezervor și rețea de distribuție) din orașul București se ia o cantitate de 300 $cm^3$ apă. Se vor filtra două volume de cîte 100 $cm^3$ și două volume de cîte 50 $cm^3$.

— Pentru probele de apă din alte instalații centrale (rezervor și rețea de distribuție) se ia o cantitate de 100 $cm^3$ apă. Se vor filtra un volum de 50 $cm^3$ și două volume de cîte 25 $cm^3$.

— Pentru probele de apă din sursele locale se filtrează un volum de 25 $cm^3$, două volume de $10^3$ și un volum de 5 $cm^3$. La nevoie se pot folosi și diluții.

Pe placa suport-filtru a dispozitivului de filtrare se așează cu ajutorul pensei sterile o membrană filtrantă. Dispozitivul de filtrare se racordează la sistemul de vid prin intermediul flaconului de sticlă cu tub lateral Din proba de apă de analizat, bine omogenizată se ia fie cu pipeta gradată, fie cu un cilindru gradat volumul de apă stabilit anterior și se filtrează prin aspirație picătură cu picătură. După filtrarea volumului de apă, se clătește de 3 ori interiorul suport-filtrului cu o cantitate de 20—30 $cm^3$ soluție de lucru sterilă (apă tamponată sau ser fiziologic), filtrînd sub vid. Pentru fiecare probă de apă se va folosi un alt dispozitiv de filtrare cu suport-filtru steril. Volumele din aceeași probă se vor filtra prin același dispozitiv de filtrare, schimbînd după filtrarea fiecărui volum de apă, membrana filtrantă, iar suport-filtru se clătește cu soluție de lucru sterilă.

Dacă volumul de apă care se filtrează este mai mic de 20 $cm^3$, în suport-filtru se toarnă mai întîi o cantitate de 20 $cm^3$ soluție sterilă de lucru. Cu pensa flambată se ridică membrana filtrantă și se depune cu suprafața de filtrat în sus, pe mediul geloză lactoză cu sulfit de sodiu (Endo) turnat în plăci Petri.

Se apasă cu pensa pentru a evita formarea de bule de aer între membrană și suprafața mediului. Prepararea mediului și repartizarea lui în plăci Petri se poate face din timp și plăcile se pot păstra la rece în pungi de plastic timp de maximum 15 zile. Plăcile Petri cu membranele filtrante și acoperite se introduc cu capacul în jos, în termostat pentru incubare la 37°, timp de 24 ore.



Scanned with OKEN Scanner

După incubare se numără coloniile caracteristice de coliformi (colonii roșii cu luciu metalic pentru E.coli, roșii pînă la roșcate bombate, mucoase pentru ceilalți coliformi față de cele incolore ale lactozonegativilor) ce au crescut pe fiecare membrană filtrantă și se notează cu C numărul.

Calculul numărului de coliformi pe decimetru cub se face după formula :

$$\frac{\Sigma C}{\Sigma V} \times Vs$$

C = numărul de colonii caracteristice dezvoltate pe fiecare membrană filtrantă

V = volumele filtrate din aceeași probă de apă

Vs = volumul standard

În cazul în care s-au folosit diluții decimale, formula de calcul este :

$$\Sigma C \times \frac{F}{\Sigma V} \times Vs$$

în care F = factorul de diluție

În tehnica membranei filtrante se poate folosi o alternativă a mediului Endo, mediul agar Tergitol 7 (m-$T_7$). Studiile de laborator pe apa potabilă au arătat că acest mediu recuperează aproape de 3 ori mai mulți coliformi, decît mediul Endo. Verificarea coliformilor izolați pe agarul m-$T_7$ a arătat că ei aparțin unuia din cele 4 genuri : Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter. Prin urmare, agarul m-$T_7$ este superior mediului Endo, în special pentru izolarea coliformilor cu metabolismul alterat din apa potabilă.

Un alt mediu ce se poate utiliza pentru determinarea coliformilor fecali prin metoda membranei filtrante este mediul lactoză-bilă-acid rosolic (LBR). Sărurile biliare conținute de mediu inhibă cele mai multe bacterii gram pozitive, incluzînd formele sporulate aerobe, la fel ca și acidul rosolic, dar permit creșterea bacililor gram negativi, iar formele anaerobe sporulate nu cresc pe suprafața membranei într-o atmosferă aerobă. Coliformii fecali capabili să fermenteze lactoza cu producere de acid, cresc sub formă de colonii vizibile de culoare albastră sau albastru-verde, iar cele produse de coliformii nefecali sînt gri pînă la crem sau galbene.

În cazul probelor de apă ce conțin coliformi cu metabolismul alterat, se pot aplica unele modificări și anume, înaintea plasării membranei filtrante direct pe mediul LBR, membrana este plasată cu fața superioară pe un strat de agar lactozat fără nici un agent bactericid și lăsată la incubat la 35—37°.

Agarul lactozat este proaspăt turnat pe fața superioară a plăcii cu agar LBR. Agenții selectivi și indicatorii mediului LBR vor difuza către suprafața membranei și astfel cîtva timp acțiunea selectivă a lor va fi oprită. Incubările succesive sînt făcute la temperatura de 35—37° timp de 2 ore urmată de 44±0,5° pentru 22—24 ore.

Comitetul de Experți ai Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa recomandată pe lîngă aceste două metode și alte tehnici de teren, rapide pentru determinarea coliformilor.

### 2.4.3.3. Tehnici de teren rapide

Probele de apă care pot fi păstrate la rece, transportate la laboratorul de bacteriologie și analizate în timp de 30 h din momentul recoltării, este de preferat să fie analizate de personal calificat de laborator.

În situația în care se supraveghează, de exemplu, cursuri de apă pe o anumită perioadă de timp, în zone fără laboratoare de bacteriologie, sînt necesare însă tehnici de teren. În acest scop se poate folosi metoda membranei filtrante cu o alternativă de amînare a incubării. Metoda necesită mijloace de filtrare, filtre presterilizate, suport conținînd mediu nutritiv, pipete, eprubete pentru diluții și containere solide pentru expedierea probelor.

În acest caz, proba este filtrată pe teren, iar membrana filtrantă plasată pe un suport saturat cu mediu peptonat vitaminizat (VFH) care poate să păstreze bacteriile viabile, împiedică însă creșterea pe o perioadă de aproximativ 72 ore. Introduse în containere, filtrele se pot trimite la laborator prin poștă sau cu alte mijloace de transport. După sosirea în laborator, se transferă membranele filtrante pe plăci Petri cu medii de cultură, urmînd ca modul de lucru să fie în continuare cel menționat pentru metoda membranei filtrante.

În alte cazuri, incubarea trebuie să fie și ea efectuată pe teren, de aici rezultînd necesitatea unui spațiu limitat de incubare și a unui timp scurt de incubare, cerințe ce se pot totuși realiza pe teren. Astfel, un timp scurt de incubare va permite ca un număr maxim de analize să fie realizat în timpul afectat lucrului pe teren.

Metoda tuburilor multiple pentru determinarea coliformilor fecali necesită două temperaturi de incubare și un timp lung combinat de incubare, iar evaluarea numărului probabil de coliformi fecali (MPN) necesită 15 tuburi pentru o probă de apă analizată, ocupînd astfel un volum relativ mare din spațiul de incubat.

Metodele membranei filtrante și numărării coloniilor pe placă pentru determinarea numărului de coliformi fecali necesită doar o temperatură de incubare de $44 \pm 0{,}5°$, iar plăcile Petri și membranele ocupă un spațiu restrîns din spațiul de incubat, unde sînt păstrate maximum 2 zile.

Toți acești factori trebuie să fie luați în considerare înainte de luarea deciziei cu privire la tehnica ce trebuie utilizată pentru analiza de teren.

Comitetul de Experți al Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa indică dintre tehnicile de teren o filtrare printr-un filtru tip Seitz cu rondele filtrante standardizate, montat pe un balon Kitasato și legat la o trompă de apă de robinet sau pompă de vid.

În multe țări sînt accesibile seringi speciale cu 3 valve și potrivite pentru anumite cantități, filtrabile, autoclavabile pentru tehnica membranei filtrante.



Scanned with OKEN Scanner

Filtrarea unor volume mici de apă de 0,5—1 ml poate fi realizată prin plasarea unui filtru steril, umed, pe fața superioară a unui suport steril absorbant și adăugarea probei de apă cu o pipetă sub formă de picături mici distribuite chiar pe suprafața filtrului. Proba va fi absorbită prin filtre și prin suportul absorbant prin forța capilară și filtrul poate fi transferat pentru creștere pe mediu de cultură solid.

Tehnica numărării pe placă în teren este cel mai bine realizată prin tehnica diseminării pe placă.

Cele două tehnici, tehnica membranei filtrante, cît și cea a numărării pe placă, utilizează medii de cultură identice. Aplicabilitatea acestor metode combinate, membrana filtrantă/diseminarea în placă, trebuie să fie testată pentru fiecare mediu de cultură utilizat pentru că absorbția selectivă a nutrienților, indicatorilor, coloranților prin membrana filtrantă poate modifica condițiile de creștere pe suprafața membranei comparativ cu acelea de pe suprafața unui mediu de cultură solid.

S-a pus la punct și o metodă foarte simplă de teren pentru evaluarea contaminării fecale a apei bazată pe investigarea altor indicatori bacterieni și anume, pe detectarea enterobacteriilor producătoare de hidrogen sulfurat. Observația că prezența coliformilor în apă este în mod constant asociată cu enterobacterii producătoare de hidrogen sulfurat (Arizona, Salmonella, Proteus, Citrobacter, variante de E.coli de origine fecală) a fost folosită ca punct de plecare pentru stabilirea acestei metodologii. S-a realizat astfel un test simplu, rapid (12—18 h) și ieftin, care constă dintr-o bandă de hîrtie de filtru pe care s-a absorbit mediu de cultură concentrat introdus într-o sticlă (totul preparat steril) peste care în teren se introduc 20 ml apă, temperatura de incubare necesară fiind cuprinsă între 30—37°. Poluarea fecală este indicată de virarea culorii conținutului sticlei în negru. Concordanța acestui test a fost studiată comparativ cu testul standard de determinare a numărului probabil de coliformi fecali (MPN) și s-a caracterizat ca necorespunzător doar pentru probele cu nivel scăzut de poluare fecală.

## METODE RAPIDE DE DETECTARE A COLIFORMILOR

Laboratoarele de analiză bacteriologică a apei trebuie să fie totodată în măsură să utilizeze metode rapide pentru a evalua în anumite cazuri calitatea apei.

Utilitatea unui test rapid bacteriologic este determinată de cîțiva factori importanți incluzînd : ușurința utilizării, exactitatea, sensibilitatea, caracterul economic și buna corelație a rezultatelor cu aceea a procedurii standard. Necesitatea realizării unui astfel de test rapid a dus la punerea la punct a unor metode complicate care necesită instrumentar special, reactivi etc.

Metoda cromatografiei în strat subțire ca test prezumtiv al coliformilor, bazată pe producerea de etanol prin reacțiile metabolice ale bacteriilor, dă cele mai bune rezultate cînd există inițial cel puțin 5 coliformi/ml. La acest nivel, timpul minim de detectare a fost de 9 ore.



Scanned with OKEN Scanner

Metodă colorimetrică bazată pe β-galactozidaza : E.coli utilizînd hidroliza enzimatică a o-nitrophenylgalactozei (ONPG) la 44,5° dă rezultate pentru coliformii fecali în 8 pînă la 20 ore. S-a demonstrat că există o bună corelare între hidroliza ONPG-ului și valorile MPN a coliformilor fecali.

O altă metodă pentru numărarea rapidă și selectivă a E.coli în apă bazată pe detectarea decarboxilazei acidului glutamic, pe determinarea parametrilor optimi pentru activitatea și biosinteza acestei enzime a E.coli dă rezultate în 13 ore. Alte metode folosesc substraturi marcate cu $C^{14}$. În acest sens s-a folosit lactoza radiomarcată iar bioxidul de carbon rezultat a fost captat și radioactivitatea măsurată. Metoda a permis detectarea activității a 1—10 coliformi în stadiul de microcolonii pe membranele filtrante după 6 ore de incubare.

Într-o altă metodă s-au putut detecta între 2 și 50 coliformi în timp de 4 pînă la 5 ore, utilizînd o perioadă de 2 ore de revifiere la 30°C prin adăugarea manitolului marcat și incubarea ulterioară la 44,5°.

Totuși aceste metode rapide cer un personal calificat și un echipament sofisticat și nu pot fi adaptate la situații de autentică urgență. În consecință, s-a încercat un alt mod de abordare a problemei care constă din modificarea metodologiei standard de determinare a coliformilor, astfel ca rezultatele să poată fi obținute într-un timp mai scut ca cel obișnuit de 24—48 ore.

O astfel de metodă care necesită un echipament mai simplu, dar care dă rezultate în 8 ore, este testul rapid pentru detectarea coliformilor fecali în 7 ore. Este vorba de o metodă a membranei filtrante care utilizează un mediu de cultură cu lactoză și manitol tamponat, combinat cu un sistem indicator de pH (mediu 7 h FC) supus unei incubări la 41,5° în urma căreia coloniile de coliformi fecali apar galbene pe un fond purpuriu luminos. Testul a fost găsit corespunzător pentru examinarea apelor de suprafață și a apelor reziduale neclorinate și poate servi ca un test de urgență pentru examinarea apei de canalizare sau contaminării fecale a apei potabile. Încorporarea a două substraturi fermentabile în mediu, oferă coliformilor cu metabolismul alterat obțiunea a două căi metabolice, facilitînd deci creșterea acestor germeni și permițînd probabil și detectarea de E.coli lactozofermentativ tardiv sau lactozonegativ. Incubarea la 41,5° este un compromis între selectivitatea mai mare pentru coliformii fecali cînd este utilizată incubarea la 44,5° și îmbogățirea creșterii tuturor celorlalți coliformi enterici. Rezultatul este că există aparent o creștere optimă a coliformilor fecali care include și recuperarea celor cu metabolismul alterat.

Faptul că numărătorile de coliformi fecali în testul membranei filtrante de 24 ore și în testul rapid de 7 ore în general, corespund, indică că testul de 7 ore a evaluat o populație de coliformi fecali comparabilă cu aceea din testul de 24 ore. Testul poate fi deci folosit pentru estimarea coliformilor fecali din apă într-un timp de 8 ore. Permițînd rezultate rapide a coliformilor fecali, testul poate fi utilizat în caz de urgență pentru examinarea apei potabile în eventualitatea producerii contaminării fecale a acesteia.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.4. Determinarea cantitativă a streptococilor fecali

Conform STAS 3001/83 de analiză bacteriologică a apei, determinarea prezenței și numărului streptococilor fecali în apă, se face în situații speciale, ca în cazul alegerii unei noi surse de apă, epidemii hidrice, poluări accidentale, în supravegherea unor surse și stații de tratare și dezinfectarea apei potabile, rețele de distribuție deficitare, controlul calității dezinfecției etc.

Prezența streptococilor fecali în apă se pune în evidență prin metoda tuburilor multiple, conform STAS 3001/83 — analiza bacteriologică — apa potabilă.

### TESTUL DE PREZUMȚIE

— Pentru apa recoltată din instalațiile centrale (rezervoare și rețea de distribuție) din orașul București, se ia în lucru un volum de 300 $cm^3$ apă, din care se însămînțează cîte 100 $cm^3$ apă în două flacoane care conțin fiecare cîte 100 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu de îmbogățire, dublu concentrat, și cîte 10 $cm^3$ apă în 10 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu, de îmbogățire, dublu concentrat.

— Pentru apa recoltată din alte instalații centrale (rezervor și rețea de distribuție), se analizează un volum de 100 $cm^3$ apă, din care se însămînțează 50 $cm^3$ apă într-un flacon care conține 50 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu, de îmbogățire dublu concentrat și cîte 10 $cm^3$ în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu de îmbogățire, dublu concentrat.

— Pentru apa recoltată din surse locale (fîntîni, izvoare), se însămînțează un volum de 55,5 $cm^3$ în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu, de îmbogățire, dublu concentrat, cîte 1 $cm^3$ apă în 5 eprubete care conțin cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu, de îmbogățire, dublu concentrat ; cîte 1 $cm^3$ apă în 5 eprubete care conțin cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu, de îmbogățire și cîte 1 $cm^3$ din diluția 1/10 a apei de analizat în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion azidă de sodiu de îmbogățire. Pentru apele bănuite a fi poluate, se fac diluții în funcție de contaminarea presupusă.

Flacoanele și eprubetele însămînțate se introduc la termostat și se incubează la 37°C±0,5°C timp de 48 ore.

La 48 ore se face citirea testului de prezumție și se fac treceri pentru testul de confirmare din toate flacoanele și eprubetele unde s-a notat apariția turbidității cu sau fără sediment.

### TESTUL DE CONFIRMARE

Pentru confirmarea streptococilor fecali, se trece cu o pipetă Pasteur, una sau două picături din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive la testul de prezumție, în cîte o eprubetă cu mediu bulion azidă de sodiu și brom cresol purpur, pentru confirmare.



Scanned with OKEN Scanner

Probele se incubează la 44,5°C, timp de 48 ore. Virarea culorii mediului în galben cu sediment pe fundul eprubetei atestă prezența streptococilor fecali în apă și confirmă originea fecală a poluării.

O metodă de confirmare mai certă este oferită de folosirea mediului selectiv agar glucoză-azidă de sodiu și trifenil tetrazoliu clorid după Slanetz-Bartley. Placa Petri cu mediul sus-menționat se împarte în sectoare și în fiecare sector se însămînțează cu ansa bacteriologică cîte un flacon sau eprubetă apreciate ca pozitive, fie la testul de prezumție, fie la testul de confirmare. Pentru a obține colonii izolate se va folosi tehnica epuizării ansei.

Coloniile de streptococi fecali care se dezvoltă pe mediul agar glucoză-azida de sodiu TTC sînt rotunde cu marginea regulată, de aspect mucos și de culoare roșu închis sau roz. Pornindu-se de la o asemenea colonie caracteristică, se face un frotiu care se colorează Gram și se examinează la microscop, cu obiectivul de imersie. Dacă se observă celule sub formă de coci ovalari așezați izolați, în perechi și lanțuri scurte, Gram pozitive, se certifică prezența streptococilor fecali în apă.

## STABILIREA NUMĂRULUI PROBABIL DE STREPTOCOCI FECALI

Determinarea numărului probabil de streptococi fecali într-un $dm^3$, se face cu ajutorul tabelelor VII, VIII, IX, X McCrady, în funcție de cantitatea de apă analizată, luîndu-se în considerație flacoanele și eprubetele confirmate.

— Calculul numărului probabil de streptococi fecali/$dm^3$ apă din instalațiile centrale din orașul București se face cu ajutorul tabelului nr. VIII.

— Calculul numărului probabil de streptococi fecali/$dm^3$ apă din alte instalații centrale se face cu ajutorul tabelului nr. IX.

— Calculul numărului probabil de streptococi fecali/$dm^3$ apă din surse locale, se face cu ajutorul tabelul X.

În cazul în care s-au însămînțat mai mult de 3 diluții de apă, pentru citirea tabelului nr. X se vor lua în considerare numai o serie de 3 diluții situate la limita pozitivității, alegîndu-se ultima serie de diluție total sau parțial pozitivă — precedată de serii total pozitive — și cele două serii de diluții următoare. Numărul probabil de streptococi fecali/$dm^3$ apă se obține prin adăugarea unui număr de zerouri egal cu diferența dintre prima cantitate luată în calcul și prima cantitate citită din tabel (10 $cm^3$).

Comitetul de Experți al Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa, recomandă ca pe lîngă metoda tuburilor multiple de decelare a streptococilor fecali în apă, să se folosească asociat și una din metodele cantitative de numărare a coloniilor de streptococi fecali cum ar fi : metoda încorporării în placă, metoda membranei filtrante, sau metoda diseminării în placă, în situația cînd se supraveghează calitatea apei din centre populate cu peste 1 milion de locuitori.



Scanned with OKEN Scanner

Este folosită pentru determinarea cantitativă a streptococilor fecali din : apa poluată a lacurilor, rîurilor, apele reziduale brute ; efluenții apelor reziduale ; apa potabilă din rețelele centralizate de distribuție ; din apele freatice, izvoare.

Din proba de apă de analizat, bine omogenizată în flaconul în care a fost recoltată, se ia cu o pipetă sterilă 1 $cm^3$ și se introduce într-o cutie Petri sterilă. În cazul probelor de apă cu încărcătură bacteriană mare, se fac diluții zecimale 1/10 ; 1/100 ; 1/1 000 etc. În fiecare cutie Petri cu proba nediluată sau diluată se introduc 10—15 $cm^3$/mediu agar glucoză-azidă de sodiu TTC care trebuie preparat proaspăt și răcit la 45°C. Se omogenizează conținutul cutiilor Petri prin mișcări de rotație în plan orizontal în ambele sensuri, după care se lasă să se solidifice agarul.

Cutiile Petri însămînțate, se introduc cu capacul în jos, în termostat la 44±0,5°C timp de 44—46 ore.

În cazul probelor de apă recoltate din diferitele etape ale procesului de tratare în scopul potabilizării, ca urmare a faptului că metabolismul bacteriilor pe care le analizăm are de suferit, se recomandă o preincubare a plăcilor Petri cu probele de apă însămînțate, în temostatul de 35—37°C timp de 2—4 ore, urmînd în final incubarea la 44±0,5°C timp de 44—46 ore.

Toate bacteriile capabile să crească sub forma de colonii rotunde, cu suprafața netedă, marginea regulată și aspect mucos de culoare roșu închis sau roz, sînt considerate a fi streptococi fecali.

Se numără coloniile care s-au dezvoltat, atît la suprafață cît și în interiorul agarului, cu ochiul liber sau cu lupa. O numărare mai eficientă a coloniilor este posibilă printr-o înregistrare automată a numărătorii cu ajutorul măririi, iluminatului și marcării coloniilor cu o peniță sensibilă la presiune sau electronică. Practic pentru o numărătoare optimă, numărul coloniilor crescute trebuie să nu depășească 300 colonii. În cazul în care s-au folosit serii de diluții zecimale se opresc pentru numărarea coloniilor numai acele plăci în care coloniile au crescut în număr cuprins între 25—300 colonii.

Calculul numărului de streptococi fecali se face după formula :

$$\frac{\Sigma C}{\Sigma V} \times Vs$$

în care :

C = numărul de colonii care au crescut pe o placă Petri
V = volumul de apă însămînțat
Vs = volumul standard (100 $cm^3$)

În cazul în care s-au folosit diluții zecimale, formula de calcul este :

$$\Sigma C \times \frac{F}{\Sigma V} \times Vs$$

F = factorul de diluție



Scanned with OKEN Scanner

Prin convenție s-a stabilit ca numărul bacteriilor indicatoare ale poluării fecale să fie raportat la un volum standard de 100 $cm^3$ apă de analizat în timp ce numărul total al bacteriilor aerobe din apă să fie raportat la 1 $cm^3$ apă de analizat.

## TEHNICA MEMBRANEI FILTRANTE

Se folosește mai ales în cazul probelor de apă ce conțin un număr mic de streptococi fecali. Nu poate fi aplicată în cazul probelor de apă care conțin o cantitate mare de suspensii cu turbiditate mare. În acest caz, chiar dacă în proba de apă ce urmează a fi filtrată există un număr redus de streptococi fecali, aceștia nu se vor dezvolta bine și nu vor crește pe membrană filtrantă, datorită suspensiilor din apă. Practic, numărul optim de colonii care pot fi numărate ușor pe o membrană filtrantă cu diametrul de 45—50 mm este în jur de 100—150 de colonii. Tehnica este foarte recomandată pentru volume de apă cu densități bacteriene mici de colonii/$cm^3$.

## ÎNSĂMÎNȚAREA PROBELOR DE APĂ

Aparatura este aceeași ca la determinarea germenilor coliformi. Mărimea volumelor de apă filtrate dintr-o probă de apă se apreciază în funcție de încărcătura apei, astfel ca pe o membrană filtrantă să se obțină 25—100 colonii caracteristice de streptococi fecali.

Pe placa suport-filtru al dispozitivului de filtrare se așază cu ajutorul pensei sterile o membrană filtrantă. Dispozitivul de filtrare se racordează la sistemul de vid prin intermediul tubului lateral al flaconului de sticlă. Din proba de apă de analizat, bine omogenizată în flaconul în care a fost recoltată, se ia fie cu o pipetă gradată, fie cu un cilindru gradat, volumul de probă de apă stabilit și se filtrează prin aspirație, picătură cu picătură. După filtrarea volumului de apă, se clătește de 3 ori interiorul suport-filtrului cu o cantitate de 20—30 $cm^3$ soluție de lucru sterilă (apă tamponată, ser fiziologic), filtrînd sub vid.

Pentru fiecare probă de apă se va folosi un alt dispozitiv de filtrare cu suport-filtru steril. Volumele din aceeași probă de apă se vor filtra prin același dispozitiv de filtrare, schimbînd după filtrarea fiecărui volum de apă, membrana filtrantă, iar suport-filtrul se clătește cu soluție de lucru sterilă. Filtrarea se va face începînd cu volumul cel mai mic de apă și se continuă cu volumele următoare în ordine crescătoare. Dacă volumul de apă care se filtrează este mai mic de 20 $cm^3$, în suport-filtru se toarnă mai întîi o cantitate de 20 $cm^3$ soluție sterilă de lucru. La nevoie se pot folosi și diluții.

Cu pensa flambată se ridică membrana filtrantă și se depune cu suprafața de filtrat în sus, pe mediul agar glucoză-azidă de sodiu TTC, turnat în cutii Petri. Se apasă cu pensa pentru a evita formarea de bule de aer între membrană și suprafața mediului. Prepararea mediului și repartizarea lui în cutii Petri se poate face din timp și plăcile se pot păstra la rece timp de maximum 15 zile.



Scanned with OKEN Scanner

Cutiile Petri cu membranele filtrante acoperite se introduc în termostat cu capacul în jos pentru incubare la 44±0,5°C, timp de 44—46 ore.

În cazul probelor de apă recoltate din diferitele etape ale procesului de tratare în scopul potabilizării, ca urmare a faptului că metabolismul bacteriilor pe care le analizăm, are de suferit, se recomandă o preincubare a plăcilor Petri cu membranele filtrante în termostatul de 35—37°C timp de 2—4 ore, și apoi în continuare, incubarea la 44±0,5°C, timp de 44—46 ore.

După incubare se numără coloniile caracteristice de streptococi fecali care au crescut pe fiecare membrană filtrantă și se notează cu C numărul lor.

Calculul numărului de streptococi fecali se face după formula :

$$\frac{\Sigma C}{V} \times Vs$$

C = numărul de colonii caracteristice, dezvoltate pe fiecare membrană filtrantă ;
V = volumele filtrante din aceeași probă de apă
Vs = volumul standard
În cazul în care s-au folosit diluții zecimale, formula de calcul este :

$$\Sigma C \times \frac{F}{\Sigma V} \times Vs$$

F = factorul de diluție

## TEHNICA DISEMINĂRII ÎN PLACĂ

Această tehnică este folosită mai ales pentru diferențierea coloniilor, datorită faptului că pe suprafața mediului geloză nutritivă cresc diferite tipuri de colonii care se găsesc în proba de apă de analizat. Cantitatea de apă utilizabilă pentru diseminarea ei pe suprafața mediului, este de 0,1 $cm^3$, dar se pot folosi și volume de 0,5 sau maximum de 1 $cm^3$.

În ceea ce privește tehnica diseminării volumului de apă la suprafața mediului, există controverse în literatura de specialitate. Unii microbiologi recomandă diseminarea cu ajutorul spatulei de sticlă, în timp ce alții susțin că au obținut rezultate bune, comparabile atît prin folosirea spatulei de sticlă, cît și prin folosirea altor mijloace de diseminare. Teoretic diseminarea cu spatulă de sticlă duce la o pierdere a unei părți din volumul de apă care rămîne pe bagheta de sticlă. De aceea, această metodă de diseminare nu este recomandată.

După Comitetul de Experți ai Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa, tehnica de diseminare a volumului de apă la suprafața mediului, care dă rezultatele cel mai bune este următoarea : proba de apă se omogenizează bine în flaconul în care a fost recoltată prin mișcări rotatorii. Cu o pipetă sterilă de 0,1 $cm^3$ cu bulă la vîrf se ia 0,1 $cm^3$ probă de apă și prin mișcări rapide în zig-zag ale pipetei se împrăștie pe toată suprafața mediului făcîndu-se prin atingere ușoară. De preferat ca plăcile Petri să fie



Scanned with OKEN Scanner

așezate pe o masă rotitoare, care permite rotirea succesivă a plăcii, astfel dispersia făcîndu-se mai bine.

Se recomandă ca turnarea mediului agar glucoză-azidă de sodiu TTC în plăcile Petri să se facă din timp, iar plăcile cu mediul să fie uscate bine, fie ținute peste noapte inversate, cu capacul în jos, la termostatul de 37°C, fie ținute 1—2 ore la termostatul de 44°C, tot inversate, dar fără capac.

Cutiile Petri însămînțate cu proba de apă sînt introduse în termostatul de 44±0,5°C timp de 44—46 ore, cu capacul în jos.

Se numără coloniile caracteristice de streptococi fecali de la suprafața mediului cu ochiul liber sau cu lupa. O numărare mai rapidă a coloniilor este posibilă printr-o înregistrare automată a numărătorii cu ajutorul unei lupe măritoare, iluminării și marcării coloniilor cu o peniță sensibilă la presiune sau electronică.

Pentru o numărătoare optimă, numărul coloniilor trebuie să fie cuprins între 100 și 300 pe placă. În cazul în care s-au făcut diluții, se opresc pentru numărarea coloniilor acele plăci în care coloniile au crescut în număr cuprins între 25—300 colonii.

Se notează cu C numărul coloniilor de pe o placă Petri, cu V volumul de apă însămînțat și atunci cînd se folosesc diluții, cu F factorul de diluție.

Calculul numărului de streptococi fecali se face după formula :

$$\frac{\Sigma C}{\Sigma V} \times Vs \text{ sau } \Sigma C \times \frac{F}{\Sigma V} \times Vs$$

Vs = volumul standard.

## 2.4.5. Determinarea cantitativă a clostridiilor anaerobe sulfito-reducăoare și a speciei Clostridium perfringens în apă și nămol (Metoda Institutului de Igienă și Sănătate Publică București)

### A. TEHNICA PENTRU APĂ

Determinarea numărului de clostridii sulfito-reducătoare se face prin metoda tuburilor multiple, o metodă aplicabilă tuturor categoriilor de ape și care furnizează date de evaluare a celui mai probabil număr de clostridii sulfito-reducătoare folosind un mediu lichid în condiții de anaerobioză.

Obținerea anaerobiozei este asigurată prin înlăturarea oxigenului dizolvat din mediu, procedeul fizic utilizat fiind regenerarea prin menținerea în apă în fierbere sau în vapori fluenți a flacoanelor sau tuburilor cu mediu. Ca urmare, vaporii formați în masa mediului antrenează și oxigenul dizolvat în acesta. După regenerare, flacoanele sau tuburile se



Scanned with OKEN Scanner

răcesc brusc în apă. Protecția anaerobiozei se realizează pe lîngă raportul redus suprafață/volum prin :

— acoperirea suprafeței mediului cu un strat izolator de ulei de parafină steril și

— introducerea în momentul preparării a unei substanțe reducătoare direct în mediu ca : glucoza 0,2%, cistenia hidroclorică 0,05%, eventual 0,5—1 g agar pentru un volum de un litru bulion, care limitează solvirea oxigenului în bulionul regenerat.

Mediul bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare conține un indicator de culoare pentru a evidenția starea de oxido-reducere a mediului, resazurină sau albastru de metilen. Atîta timp cît colorarea mediului de la suprafață spre profunzime nu depășește 1/4 din înălțimea coloanei de lichid, mediul poate fi folosit ca atare, în caz contrar, se folosește după o prealabilă regenerare la 100°C.

Numărul probabil de clostridii sulfito-reducătoare poate fi estimat utilizînd cantități variabile de apă ca în schema de lucru folosită pentru testul prezumtiv al coliformilor și streptococilor fecali. În acest scop se folosește în testul de prezumție pentru volume de apă de însămînțat de 10 $cm^3$ sau mai mari de 10 $cm^3$ bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare dublu concentrat. Același mediu simplu concentrat se folosește pentru volume de apă de însămînțat de 1 $cm^3$.

Pentru determinarea numărului de spori de clostridii sulfito-reducătoare, probele de apă sînt inactivate : în prealabil introduse în baia de apă la temperatura de 60°C, temperatura este ridicată treptat și menținută timp de 15 minute la 80°C pentru a distruge toate formele vegetative ale bacteriilor din apă. Apoi, probele de apă ca atare și după necesitate, diluțiile decimale ale acestora, sînt însămînțate în balonașe și eprubete cu mediu regenerat la baia de apă la temperatura de 100°C, răcit brusc, folosind pipete de capacitate mai mare ca volumul ce trebuie însămînțat ce vor fi introduse în profunzimea mediului, lăsînd să cadă liber fără a sufla în ele volumul de apă însămînțat.

Un strat de 0,5—1 cm ulei de parafină steril este adăugat la suprafața bulionului inoculat pentru a menține condițiile de anaerobioză. Probele sînt apoi incubate la temperatura de 37°C timp de 48 ore. Citirea se face la 24 de ore și se completează și corelează cu citirea definitivă a testului după 48 de ore. O reacție pozitivă este indicată de înnegrirea mediului și se notează numărul de balonașe și eprubete cu mediu înnegrit. Pe baza acestor rezultate, se calculează folosind tabelele Mc Crady, numărul probabil de spori de clostridii sulfito-reducătoare pentru 100 $cm^3$ probă de apă analizată și prin extrapolare la decimetru cub.

Teste bacteriologice suplimentare, ca de exemplu, comportarea față de cazeină și prezența lecitinazei, trebuie efectuate pentru confirmarea speciei Clostridium perfringens. Un inocul de 1 $cm^3$ este transferat din balonașe sau eprobete cu bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare pozitive la 48 ore (sau la 24 de ore dacă reacția este deja pozitivă), în profunzime în eprubetele conținînd lapte simplu sau lapte turnesolat steril repartizat în volum de 10 $cm^3$ și regenerat la temperatura de 100°C timp de 20—30 minute.



Scanned with OKEN Scanner

Laptele este apoi incubat la temperatura de 37°C timp de 48 de ore. Citirile se fac la 24 și 48 de ore. Apariția cheagului alveolar denotă prezența cu probabilitate de 80—90% a speciei Clostridium perfringens*.

Laptele turnesolat în urma dezvoltării speciei Clostridium perfringens capătă un aspect caracteristic : datorită fermentării lactozei se înroșește. Este coagulat în totalitate, fiind sfîșiat de gaze. Cheagul format este lipit de unul din pereții eprubetei, locul rămas liber este umplut cu un zer de culoare gălbuie, care se clarifică pe măsură ce trece timpul și bacteriile se depun, proteina din lapte fiind lizată. Deasupra, se găsește un cheag mai mic, buretos, cu aspect de dop spongios de culoare intens roșie. În cazul laptelui fără turnesol, aspectul caracteristic de cheag alveolar este identic, dar fără coloratia specifică.

Pentru determinarea numărului probabil de spori de Clostridium perfringens inoculul de 1 $cm^3$ este transferat din fiecare balonaș sau eprubetă cu bulion pentru clostridă sulfito-reducătoare pozitiv, în eprubete cu lapte simplu sau lapte turnesolat steril. Numărul probabil de spori de Clostridium perfringens se calculează pornind de la numărul de tuburi pozitive din testul cheagului alveolar, folosind de asemenea, pentru calcul, tabelele McCandy.

Prezența lecitinazei se determină folosind plăci cu mediu Nagler sau Willis-Hobbs ce se însămînțează în suprafață folosind metoda pentagonului. La marginea plăcii se depun 3—4 picături de bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare pozitiv din care se trag cu ansa flambată striuri paralele, alte striuri din capătul acestora și apoi altele, pînă ce s-a realizat un pentagon încadrat în cercul plăcii Petri. Pentru realizarea condițiilor de anaerobioză se folosește metoda pirogalolului alcalin, ce constă din utilizarea unor pliculețe cu amestec pentru realizarea anaerobiozei lipite de capacul plăcii Petri conținînd pirogalol, una din substanțele cu mare putere de absorbție a oxigenului, urmată de parafinarea plăcii pentru a o etanșeiza.

Reacția lecitinazei constă din opacifierea care se observă în jurul coloniilor pe mediile Nagler sau Willis-Hobbs, conținînd gălbenuș de ou și se datorează producerii unor enzime specifice, lecitinaze, care difuzează în jurul colonilor și atacă lecitina din gălbenușul de ou. Această reacție este produsă de cîteva specii ale genului Clostridium și în primul rînd este produsă în mod specific de Clostridum perfringens, a cărui exotoxină principală, alfa-toxina este o lecitinază.

Plăcile cu mediu Willis-Hobbs pe care se observă activitatea lecitinazei se deschid permițînd contactul cu aerul. În cazul speciei Clostridium perfringens, după 1—2 ore coloniile se vor colora în roz-roșietic, datorită fermentării lactozei, prin aceasta Clostridum perfringens putînd să se diferențieze de alte specii lecitinazo-pozitive dar lactozo-negative, ca de exemplu, Clostridium bifermentans.

Ca urmare, folosirea laptelui fără turnesol, se recomandă cînd în paralel se utilizează mediul Willis-Hobbs care conține lactoză și permite evidențierea fermentării acesteia, datorită prezenței roșului neutru în compoziția sa, iar a laptelui cu turnesol în paralel cu mediul Nagler.

---

* — O reacție oarecum asemănătoare a cheagului alveolar, dar mai puțin exprimată, este produsă de C. butyricum și de asemenea, de specia C. septicum, dar de aceasta mult mai lent în 3—10 zile, ambele fiind lecitinazo-negative.



Scanned with OKEN Scanner

Avînd în vedere că frecvent în ape, în special în cele reziduale, flora asociată sporilor de clostridii este masivă, pe lîngă procedeul inițial, selectiv de inactivare a probei de apă la 80°C pentru distrugerea formelor vegetative, o metodă eficientă care permite însă menținerea pe lîngă sporii de clostridii și a bacililor aerobi sporulați din genul Bacillus (cu cîteva specii facultativ anaerobe), se recomandă pentru izolarea speciei Clostridium perfringens cu bune rezultate, încorporarea a 100 mcgl/ml neomicină la mediul Nagler sau a 250—300 mcg/ml neomicină la mediul Willis-Hobbs modificat. Controlul culturilor de pe mediile Nagler și Willis-Hobbs se va face prin repicarea unui număr de 5—10 colonii pe plăci cu geloză 2% în aerobioză, avînd ca rezultat lipsa creșterii după incubarea timp de 24 h la 37°C.

Asocierea proprietății de a produce cheag alveolar în lapte, cu cea a opacifierii mediului cu gălbenuș de ou prin producerea lecitinazei, este strict specifică pentru Clostridium perfringens, deoarece nici o altă specie din genul Clostridium (sau din alte genuri) nu produce simultan cele două reacții. În cadrul unei ape reziduale încărcate, în care clostridiile sulfito-reducătoare sînt prezente pînă la diluții mari ($10^4$) și confirmarea speciei Clostridium perfringens prin testul cheagului alveolar, se realizează de asemenea, pînă la diluții mari, se recomandă să se facă treceri pe mediul cu gălbenuș de ou (Nagler sau Willis-Nobbs modificat), avînd incorporat antibioticul din ultimile două diluții ale mediului de îmbogățire. Examenul microscopic, prezintă la coloratia Gram aspectul caracteristic de bacili de lungime variabilă (4—8 μ), groși (0,8—1,2 μ), drepți cu capete rotunjite, Gram pozitivi.

## B. TEHNICA PENTRU NĂMOL

În cazul analizării unor probe de nămol, după omogenizarea acestora, se realizează o suspensie bacteriană prin cîntărirea în condiții sterile a unui eșantion de 100 g nămol peste care se adaugă 1 000 $cm^3$ ser fiziologic steril, se agită intermitent timp de 30 minute cu perle de sticlă, după care se lasă circa 10—15 minute în repaus pentru sedimentarea particulelor grosiere din nămol. Din supernatantul inactivat la 80°C timp de 15 minute, se pregătesc apoi diluții decimale în ser fiziologic care se însămînțează (folosind serii de 5 tuburi pentru fiecare volum de 10 $cm^3$ și 1 $cm^3$ de supernatant sau diluție decimală a acestuia) în mediul bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare dublu concentrat și respectiv simplu concentrat.

În continuare se urmează tehnica descrisă mai sus. Se citesc rezultatele în tabelele Mc Crady și se procedează la testul de confirmare a cheagului alveolar și lecitinazei pentru Clostridium perfringens. Exprimarea cantitativă se recomandă să fie făcută pe gram nămol uscat (la temperatura de 105°C). Rezultatele analizei se corectează pentru umiditatea probei respective prin folosirea unui factor de corecție K, care se calculează în funcție de procentul de umiditate a nămolului, după următoarea formulă :

$$K = \frac{100}{100 - U\%}$$



Scanned with OKEN Scanner

în care :

U% = procentul de umiditate al probei.

$$\text{Numărul probabil de clostridii sulfito-reducătoare} = \frac{\text{nr. din tabelele Mc Crady}}{100} \times K$$

## ALTE METODE DE DECELARE A CLOSTRIDIILOR ANAEROBE SULFITO-REDUCĂTOARE ÎN APĂ

Alte metode ce pot fi folosite pentru analiza cantitativă a sporulaților anaerobi se bazează pe numărătoarea coloniilor de culoare neagră produse de bacteriile ce supraviețuiesc încălzirii la 80°C pe mediul peptonă — sulfit de fier-agar la temperatura de 44 ± 0,5°C în timp de 24 ± 2 ore. Tehnicile ce pot fi utilizate sînt : inocularea în tuburi, încorporarea în placă sau tehnica membranei filtrante. Coloniile de culoare neagră dezvoltate pe mediul mai sus menționat, se presupune că sînt produse de bacterii reducînd sulfitul la sulfură care reacționează cu fierul bivalent, formînd sulfura feroasă de culoare neagră.

Aceste metode pot fi utilizate pentru toate categoriile de ape. Pentru tehnica membranei filtrante pot fi lolosite orice cantități de apă, ținînd cont de restricțiile în utilizarea acestei tehnici, care este recomandată pentru ape cu turbiditate redusă și cu densitate bacteriană mică. Dacă nu se poate utiliza tehnica membranei filtrante, volumul maxim de apă de cercetat prin celelalte două tehnici este de 50 ml urmat de volume descrescînde de probe de apă de : 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 și 0,1 $cm^3$ apă. Pentru cantități de apă de cercetat mai mari de 2,5 $cm^3$ se recomandă tehnica inoculării în tuburi, iar dacă trebuie testate cantități mai mici de 0,1 $cm^3$ se diluează proba de apă de cercetat cu diluent steril (diluții decimale) și se utilizează volume de testat de 1, 0,5 și 0,25 $cm^3$.

## TEHNICA INOCULĂRII ÎN TUBURI

Se prepară mediul de cultură peptonă-sulfit de fier-agar final simplu (I) și dublu concentrat (II) (mediul de bază + soluțiile de sulfit de sodiu și sulfat feros, conform anexei de medii). Se introduc volumele de apă de cercetat alese în tuburi. Dacă este necesar se adaugă diluant așa cum este prezentat în tabelul nr. XIII. Pentru inactivarea probelor de apă tuburile se plasează în baia de apă la 60°C și se ridică treptat temperatura la 80°C, menținîndu-se timp de 15 minute. Se scot tuburile din baie și se răcesc la aproximativ 43—45°C. Se adaugă mediul de cultură în tuburi amestecînd cu atenție pentru a nu introduce aer. Se solidifică apoi rapid mediul prin plasarea într-o baie de apă rece, după care, cît mai rapid posibil se introduc tuburile în termostat la 44 ± 0,5°C.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XIII*

**Detalii privind tehnica inoculării în tuburi pentru bacteriile anaerobe sulfito-reducătoare**

| *Volumul de apă de cercetat mediul de cultură* | *Volume de apă de cercetat pentru tuburi* | |
|---|---|---|
| | *18 × 180 mm*<br>*16 × 160 mm* | *25 × 250 mm* |
| Volumul de apă mediul I | 0 ,1—1 $cm^3$<br>completare | 1—10 $cm^3$<br>completare |
| Volumul de apă<br>diluent steril<br>mediul II<br>mediul I | 2,5 și 5 $cm^3$<br>pînă la 10 $cm^3$<br>10 $cm^3$<br>completare | 25 $cm^3$<br>pînă la 50 $cm^3$<br>50 $cm^3$<br>completare |
| Volumul de apă<br>mediul II<br>mediul I | 10 $cm^3$<br>10 $cm^3$<br>completare | 50 $cm^3$<br>50 $cm^3$<br>completare |

## TEHNICA MEMBRANEI FILTRANTE

Probele de apă de cercetat se inactivează în același mod ca pentru tehnica inoculării în tuburi. La mediul agar nutritiv de bază simplu concentrat (I) răcit la 45°C se adaugă cele două soluții de sulfit de sodiu și sulfat feros, cu atenție pentru a nu introduce aer (conform anexei de medii).

Dintr-un volum de 100 $cm^3$ mediu agar nutritiv de bază și respectiv 200 $cm^3$ se pot turna 7—8 plăci Petri de 50—60 mm ∅ și respectiv 90—95 mm ∅.

Se filtrează volumul de apă de cercetat prin membrana filtrantă și se așază aceasta pe suprafața mediului din placă cu fața în jos. Se adaugă agarul de acoperire peste membrana filtrantă într-un strat subțire de 5—6 mm (15 $cm^3$ pentru plăcile cu ∅ = 50—60 mm și 30 $cm^3$ pentru cele cu ∅ = 90—95 mm. Se solidifică mediul, după care se pun plăcile cu membrane filtrante în termostat.

## TEHNICA ÎNCORPORĂRII ÎN PLACĂ

Din probele de apă de cercetat inactivate se iau cu pipeta sterilă cîte 1 $cm^3$ și se introduc în cîte o placă Petri sterilă. Se procedează la fel pentru diluțiile decimale ale probelor de apă. Se toarnă peste volumele de 1 $cm^3$ de apă mediul agar nutritiv simplu concentrat, preparat ca în tehnica membranei filtrante prin adăugarea celor două soluții la mediul de bază. Se omogenizează conținutul plăcilor Petri, se lasă să se solidifice agarul. Peste acesta se toarnă agar de acoperire preparat ca în tehnica membranei filtrante (prin adăugarea uneia din cele două soluții la agar de bază) într-un strat de 5—6 mm peste agarul nutritiv solidificat. Se lasă din nou să se solidifice, după care cît mai repede se introduc în termostat.



Scanned with OKEN Scanner

*Incubarea pentru toate cele trei tehnici* se face la 44 ± 0,5° pentru 24 ± 2 h după care se face numărătoarea coloniilor negre cu halou negru produse de clostridiile sulfito-reducătoare din tub, de pe placă sau membrana filtrantă. Cînd pe placă apar în loc de colonii negre, colonii colorate gri pînă la alb, acesta este un semn de tehnică defectuoasă. În acest caz a fost absorbit prea mult oxigen atmosferic în mediu sau agarul de acoperire.

## EXPRIMAREA REZULTATELOR

Exprimarea densității bacteriene pentru tuburi, plăci și membrane se face după formula :

$$\frac{C}{V} \times Vs$$

C = numărul de colonii
V = volumele de apă
Vs = volumul standard de 100 $cm^3$

## METODE DE NUMĂRARE A SPECIEI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS DIN APĂ

Se pot folosi mai multe medii selective pentru numărarea ( pe placă sau folosind tehnica membranei filtrante) celulelor vegetative viabile și a sporilor de Clostridium perfringens conținînd unul sau mai multe antibiotice adăugate în anumite concentrații la mediul de bază pentru inhibarea florei de asociație ;

— mediul sulfit-polimixină B sulfat-sulfadiazină agar (SPS) după Angelotti ;

— mediul sulfit-polimixină B sulfat-neomicină agar (SPN) după Marshall ;

— mediul Shaidi-Ferguson perfringens agar (SFP) conținînd polimixină B sulfat, kanamicină sulfat și gălbenuș de ou ;

— mediul triptonă-sulfit-cicloserină-agar (TSC) constînd din același mediu de bază ca și agarul Shaidi-Ferguson, dar cu un adaus de 40 mcg D-cicloserină/ml în loc de kanamicină și polimixină B sulfat. Mediul se bazează prin urmare pe toleranța speciei Clostridium perfringens față de D-cicloserină, pe capacitatea ei de a produce lecitinază și de a reduce sulfitul permițînd astfel izolarea celor mai multe tulpini de Clostridium perfringens și inhibînd practic toți anaerobii facultativi.

Bisson și Cabelli au evaluat recent o tehnică a membranei filtrante pentru determinarea cantitativă a speciei Clostridium perfringens din apă, utilizînd un mediu de bază (MCP) pe care creșterea speciei Clostridium perfringens a fost îmbunătățită prin adăugarea de fier, recuperarea maximă atingîndu-se cînd mediul de bază a fost suplimentat cu 9 mg clorură ferică pentru 100 ml mediu. Inhibarea florei de asociație cu izolare maximă a speciei Clostridium perfringens s-a realizat cu ajutorul a două antibiotice : D-cicloserină 40 mg/ml și polimixină B sulfat 2,5 mg/100 ml mediu.



Scanned with OKEN Scanner

Procentele cele mai mari de izolări s-au obținut la temperatura de 45°C, optimă pentru dezvoltarea speciei și aleasă pentru că temperaturile de 44 pînă la 45°C sînt utilizate pentru cercetarea altor indicatori. Perioada de incubare optimă este 18—24 h, depășirea acesteia neîmbunătățind procentele de izolare.

Printre testele diferențiale incluse în mediu se numără fermentarea sucrozei, producerea de acid fosfatază și absența activității B-D-glucozidazei (Clostridium perfringens este Suc + $Phos^+$, $Celo^-$). Pentru a evidenția hidroliza gelatinei care este o caracteristică majoră de diferențiere a Clostridiei perfringens de alte clostridii, fără a fi necesară subcultivarea coloniilor se transferă membrana cu o pensă sterilă de pe mediul pentru Clostridia perfringens pe o placă cu mediu cu gelatină, se incubează 1—2 ore la 37°C, se îndepărtează membrana și se inundă cu 1—2 ml reactiv Frazier. Coloniile de pe membrană corespunzînd hidrolizei sînt socotite gelatinazo-pozitive.

Bisson și Cabelli, au raportat că 93% din coloniile care s-au numărat pe acest mediu, ca și coloniile prezumtiv pozitive de Clostridium perfringens au fost ulterior confirmate prin teste de identificare și anume : bacili gram pozitivi, imobilitate, reducerea sulfitului, coagularea laptelui, anaerobioza strictă, fermentarea lactozei, prezența gelatinazei, reducerea nitraților.

Prin urmare, în această tehnică combinarea incubării în condiții de anaerobioză la 45°C și substanțelor inhibitoare incluse în mediu, reduce densitatea florei de asociație, permițînd izolarea speciei Clostridium perfrigens.

Selectivitatea acestei metode pentru numărarea sporilor de Clostridium perfringens poate fi, de asemenea, crescută prin inactivarea prin încălzire a probelor de apă pentru a distruge celulele vegetative, inclusiv cele de Clostridium perfringens.

În acest fel, metoda utilizînd probe de apă inactivate, furnizează o estimare cantitativă a sporilor de Clostridium perfringens conținuți în proba respectivă, iar diferențierea de probele de apă ce nu au fost inactivate furnizează o estimare cantitativă a celulelor vegetative de Clostridium perfringens.

## 2.4.6. Determinarea cantitativă a bacteriofagilor enterici din apă

Metoda folosită este metoda tuburilor multiple.

### ÎNSĂMÎNȚAREA APEI

Întrucît se decelează prezența a 2 bacteriofagi enterici, se vor folosi două serii de eprubete și flacoane pentru fiecare categorie de apă.

— Pentru apa recoltată din instalațiile centrale (rezervor și rețea de distribuție) din orașul București, se ia în lucru un volum de 300 $cm^3$, din care se însămînțează cîte 100 $cm^3$ probă în două flacoane care conțin fiecare cîte 100 $cm^3$ mediu bulion tripticar dublu concentrat.



Scanned with OKEN Scanner

— Pentru apa recoltată din alte instalații centrale (rezervor și rețea de distribuție) se analizează o probă de 100 $cm^3$ din care se însămînțează 50 $cm^3$ probă într-un flacon care conține 50 $cm^3$ bulion tripticar dublu concentrat și cîte 10 $cm^3$ probă în cîte 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion tripticar dublu concentrat.

— Pentru apa recoltată din surse locale (fîntîni, izvoare) se însămînțează volumul de 55,5 $cm^3$ astfel :

— cîte 10 $cm^3$ probă de apă în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion tripticar dublu concentrat ;

— cîte 1 $cm^3$ probă de apă în 5 eprubete ce conțin 10 $cm^3$ mediu bulion tripticar simplu ;

— cîte 1 $cm^3$ probă de apă diluată 1/10 în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion tripticar simplu.

În cazul cînd se folosește pentru alte categorii de apă decît cele potabile, se va însămînța în continuare, în același mod, din diluțiile următoare $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$ etc.

## ÎMBOGĂȚIREA CU TULPINI TEST

După ce proba de apă a fost însămînțată conform schemei de mai sus, se introduce cultura de 2—3 ore de tulpină lizosensibilă Salmonella Typhi Vi în seria de eprubete și flacoane însămînțate pentru identificarea bacteriofagului enteric typhic și cultura de 2—3 ore de tulpină lizosensibilă de Escherichia coli în seria de flacoane și eprubete însămînțată pentru identificarea bacteriofagului enteric coli. Inocolul de cultură este de 1 $cm^3$ pentru flacoane și 0,2 $cm^3$ pentru eprubete*.

*Incubarea* se face la +37°C timp de 16—18 h.

*Separarea* bacteriofagilor de bacterii se realizează prin menținerea flacoanelor și eprubetelor în apă încălzită la 56—68°C timp de 50 minuite, temperatură la care sînt inactivate termic bacteriile și rezistă doar bacteriofagii.

## TESTAREA LIZEI BACTERIOFAGICE

— se folosesc două plăci cu geloză nutritivă 2% (cînd se lucrează cu mai multe diluții se folosesc 4 plăci).

Pe fundul plăcii cu geloză, se desemnează pătrate cu creionul de sticlă (fig. 5). Cu ajutorul unei anse, avînd bucla de 2—3 mm diametru, se etalează pe o placă cultura de 3 h de Salmonella Typhi A Vi în bulion tripticar, iar pe cealaltă placă cultura de 3 h de Escherichia coli în bulion tripticar.

În fiecare pătrat, se va face etalonarea culturii, sub formă de arii rotunde de circa 1 cm diametru, executîndu-se o mișcare de spirală la suprafața gelozei nutritive 2%, pornind din centrul rondelei, cu ajuto-

---

* *Observație :* tulpinile test lizosensibile autorizate Salmonella typhi Vi I.C. 10779 și Escherichia coli Bruxelles I.C. 10164 se pot obține cu adresă scrisă, fie de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino" — laboratorul de culturi microbiene, fie de la Institutul de Igienă și Sănătate Publică București — laboratorul igiena apei.



Scanned with OKEN Scanner

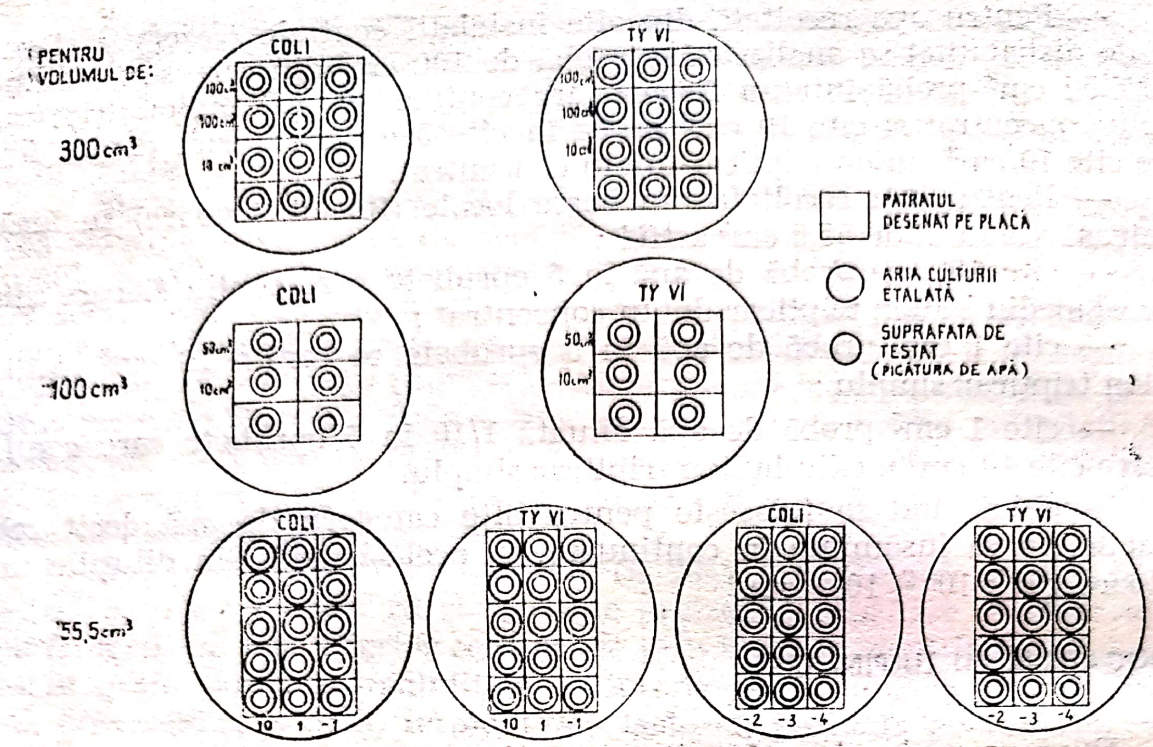



*Fig. 5* — Tehnica etalării culturilor de Escherichia coli și Salmonella typhi Vi pe păcile cu geloză și depunerea picăturii din apa de cercetat

rul ansei cu bucla de 3 mm. Numărul ariilor de pe placă, trebuie să corespundă numărului flacoanelor și eprubetelor care sînt de testat.

Se lasă 5 minute să se îmbibe cultura în geloza nutritivă. Se depune apoi cîte o picătură, cu ansa (bucla de 2 mm diametru) din conținutul fiecărui flacon și eprubetă, care a fost îmbogățită cu Salmonella Typhi Vi, în mijlocul fiecărei arii de cultură de Salmonella Typhi Vi.

La fel se procedează și pentru cea de a doua serie de eprubete care au fost îmbogățite cu Escherichia coli, depunîndu-se cîte o picătură din conținutul fiecărui flacon și eprubetă în mijlocul fiecărei arii de cultură.

Atenție ! — ansa se flambează înainte și după fiecare depunere de picătură.

Se lasă să se îmbibe în geloză, picătura depusă.

*Incubarea* se face la 37°C timp de 4—6 ore.

## CITIREA LIZEI BACTERIOFAGICE

Liza bacteriofagică în funcție de densitatea bacteriofagilor, poate să apară sub formă de plaje, liză semiconfluentă, liză confluentă și liză opacă (fig. 6).

Plajele apar pe suprafața de testare sub forma unor zone de liză, de diverse dimensiuni, rotunde, clare și izolate.

Liza confluentă — cînd în interiorul suprafeței de testare nu se constată creșterea culturii, aria de liză fiind clară.

Liza opacă — cînd interiorul suprafeței de testat este acoperit de o cultură secundară crescută, înconjurată de un inel de liză completă sau

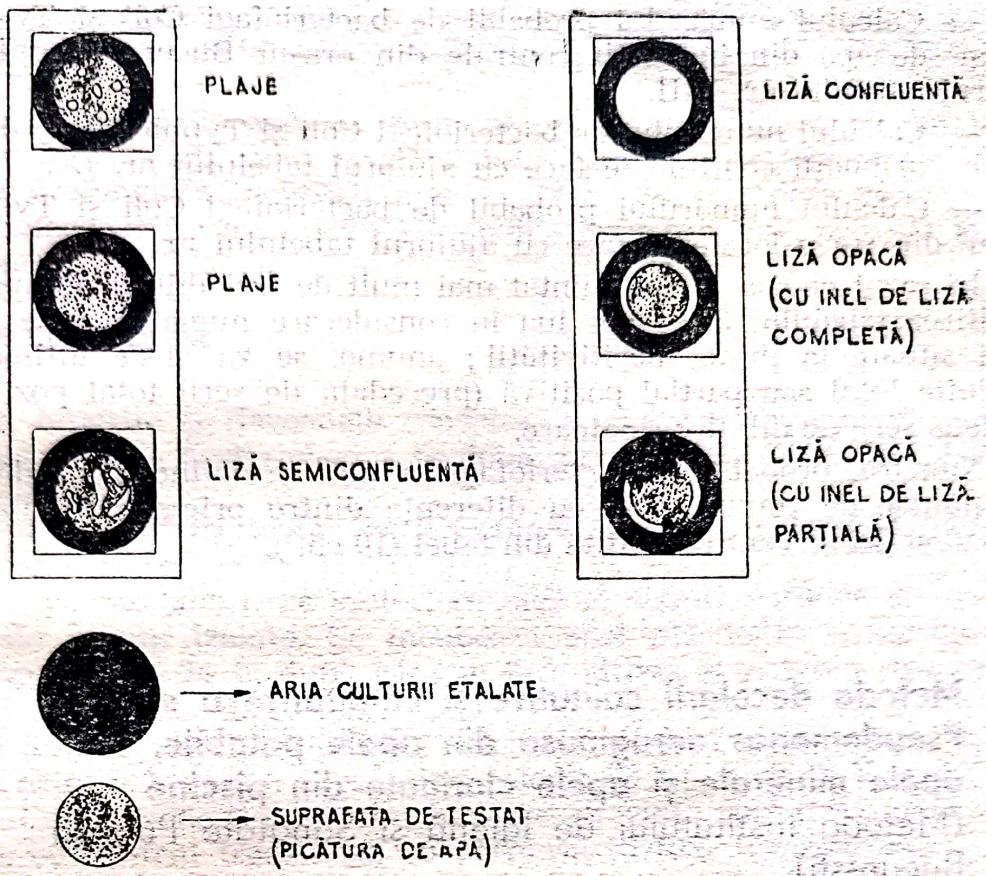



*Fig. 6* — Formele de liză

parțială. Cultura secundară crescută este dată de multiplicarea variantelor fago-rezistente dezvoltînd colonii pe aria de liză și dă opacitatea suprafeței acesteia.

Citirea lizei bacteriofagice se face cu ochiul liber sau cu lupa, atît imediat după incubare, cît și a doua zi, după păstrare 18—20 ore la +4°C (frigider).

## NOTAREA REZULTATELOR

Se notează rezultatul pentru fiecare flacon și eprubetă în parte, cu inițialele formei de liză, astfel :

Pl. pentru plaje
LSC pentru liză semiconfluentă
LC pentru liză confluentă
LO pentru liză opacă

## STABILIREA NUMĂRULUI PROBABIL DE BACTERIOFAGI COLI ȘI TYPHIC VI

Determinarea numărului probabil de bacteriofagi Coli și Typhic Vi, se face în mod convențional, raportînd la capacitatea de 1 $dm^3$, cu ajutorul tabelelor Mac Crady în funcție de volumul de apă analizat, luîndu-se în considerare flacoanele și eprubetele confirmate (conform STAS-ului 3001/1983).

— Calculul numărului probabil de bacteriofagi Coli și Typhic Vi pe $dm^3$ de apă din instalații centrale din orașul București se face cu ajutorul tabelului nr. VIII.

— Calculul numărului de bacteriofagi Coli și Typhic Vi pe $dm^3$ apă din alte instalații centrale se face cu ajutorul tabelului nr. IX.

— Calculul numărului probabil de bacteriofagi Coli și Typhic Vi pe $dm^3$ din surse locale se face cu ajutorul tabelului nr. X.

În cazul cînd s-au însămînțat mai mult de trei diluții de apă, pentru citirea tabelului 3, se vor lua în considerare numai o serie de trei diluții situate la limita pozitivității ; anume, se va alege ultima serie de diluție total sau parțial pozitivă (precedată de serii total pozitive) și cele două serii de diluții următoare.

Numărul probabil de bacteriofagi pe $dm^3$ se obține prin adăugarea unui număr de zerouri egal cu diferența dintre prima cantitate luată în calcul și prima cantitate citită din tabel (10 $cm^3$).

## 2.4.7. Metoda decelării calitative și cantitative a speciei Pseudomonas aeruginosa din apele potabile, apele minerale și apele clorinate din piscine (Metoda Institutului de Igienă și Sănătate Publică București)

### TESTUL DE PREZUMȚIE

— Pentru apa potabilă (din rețeaua de distribuție a municipiului București, ape plate și ape minerale îmbuteliate pentru export) se ia în lucru un volum de 300 $cm^3$. Se însămînțează cîte 100 $cm^3$ probă, în flacoane care conțin fiecare cîte 100 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu și cîte 10 $cm^3$ probă în 10 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu.

— Pentru apele plate, minerale, răcoritoare îmbuteliate, de uz intern și apele potabile furnizate de instalațiile centrale urbane și rurale, se ia în lucru un volum de 100 $cm^3$. Se însămînțează 50 $cm^3$ probă într-un flacon care conține 50 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu și cîte 10 $cm^3$ probă în cîte 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ mediu bulion lauryl sulfat simplu.

— Pentru apa clorinată din piscine și surse individuale se însămînțează un volum de 55,5 $cm^3$ astfel :

— cîte 10 $cm^3$ probă de apă în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu ;

— cîte 1 $cm^3$ probă de apă în 5 eprubete care conțin cîte 10 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu ;

— cîte 1 $cm^3$ probă de apă diluată $10^{-1}$ în 5 eprubete care conțin fiecare cîte 10 $cm^3$ bulion lauryl sulfat simplu.



Scanned with OKEN Scanner

*Observație*: pentru apele clorinate se introduce în flacoanele de recoltă 1 $cm^3$ soluție 0,5% de tiosulfat de sodiu pentru 100 $cm^3$ probă.

Flacoanele și eprubetele însămînțate, se introduc în termostat și se incubează la 37°C timp de 44 ± 4 h. Absența creșterii microbiene obligă la prelungirea incubării pînă la 72 h. Se consideră pozitive tuburile și flacoanele care prezintă turbiditate cu sau fără peliculă la suprafața mediului.

## TESTUL DE CONFIRMARE

Din tuburile și flacoanele considerate pozitive în prezumție se fac subculturi cu ansa bacteriologică pe două medii : Agar-Cetrimidă și Pseudomonas Agar F.

Pe o cutie Petri se fac 4—5 sectoare, fiecare sector corespunzînd unui tub sau flacon.

Descărcarea ansei, pe sector, se face în striuri paralele pentru obținerea de colonii izolate. Se incubează apoi plăcile la termostatul de 37°C timp de 22—24 h, după care se face citirea și notarea rezultatului pentru fiecare sector de pe placă.

Pe ambele medii, populația microbiană de Pseudomonas aeruginosa, se disociază uneori prezentînd colonii de tip S, R, S-R și M.

— Coloniile de tip „S" sînt lucioase, prezintă suprafața netedă, sînt convexe, cu centrul translucid, cu periferia turtită, transparentă.

— Coloniile de tip „R" sînt rugoase, cu margini neregulate, cu centrul ombilicat sau butonat, cu suprafața granulată cu aspect uscat.

— Coloniile de tip „S-R" sînt intermediare între tipurile „S" și „R".

— Coloniile de tip „M" sînt mucoase, rotunde, convexe, lucioase, confluente.

Deseori se pot observa culturi lizogene, prezentînd plaje datorită acțiunii litice a bacteriofagului.

Cultura degajă un miros aromatic caracteristic de trimetilamină (flori de tei).

Caracteristica esențială a coloniilor de Pseudomonas aeruginosa pe Cetrimid-Agar este culoarea lor albastru-verde dată de piocianină, iar pe Agar-F culoarea în galben, galben-verzui, dată de fluoresceină.

Uneori, pe mediul Cetrimid-Agar pot să apară și colonii de culoare roșie pînă la brun-închis ca urmare a producerii în cantități mari de piorubină.

## INTERPRETAREA REZULTATELOR

— Formarea piocianinei sau piorubinei pe mediul Cetrimid-Agar și fluoresceinei pe mediul Agar-F sînt caracteristici de confirmare a prezenței speciei Pseudomonas aeruginosa.

— Piocianina sau piorubina negativă pe mediul Cetrimid-Agar și fluoresceină negativă pe Agar-F indică absența Pseudomonasului aeruginosa.

— Apar uneori situații cînd nu se formează piocianină sau pioru-bină pe mediul Cetrimid-Agar, dar produce fluoresceină pe Agar-F. Pentru diferențierea în această situație a Pseudomonasului aeruginosa de Pseudomonas fluorescens, este necesară folosirea testelor suplimentare :

— dezvoltarea la 42°C. Se însămînțează cu cultură pură de 18 ore cîte 2 tuburi cu geloză înclinată 2%, incubîndu-se un tub la 42°C, iar celălalt tub la +4°C. Dezvoltarea germenului se urmărește timp de 1—3 zile. Dacă se dezvoltă la 42°C și nu se dezvoltă la 4°C este Pseudomonas aeruginosa ;

— dezvoltarea pe medii conținînd 1 g% TTC. Se iau 1—2 colonii de pe mediul Agar-F, ce prezintă caracterele de cultură descrise, și fluoresceină și se însămînțează în tuburi cu apă peptonată 1% + 1% TTC (trifeniltetrazolium chlorid). Se incubează la 37°C timp de 24—48 h. Tulpinile de Pseudomonas aeruginosa se dezvoltă și reduc substanța TTC în trifenilformazan (de culoare roșie), adesea formînd un văl și un depozit de culoare roșie după 24—48 h de incubare la 37°C.

Absența acestei reacții, evidențiază lipsa Pseudomonas aeruginosa.

— Recomandăm și efectuarea testului formării amoniacului din acetamidă.

Din cultură pură obținută în bulion nutritiv sau apă peptonată de 24 h la 37°C se inoculează o ansă (0,1 ml) în bulion-acetamidă. După o incubare de 20 ± 4 ore la 37°C ± 1°C se adaugă 1—2 picături reactiv Neslers și se citește imediat reacția. Reacția pozitivă — culoare galbenă. Reacție negativă — fără culoare.

*Observație* : acolo unde nu există posibilitatea ultimelor două teste folosindu-se numai testul temperaturii, este recomandat a se trimite tulpina izolată pentru identificare la Centrul de Referință din Institutul „Cantacuzino" — laboratorul Enterobacteriaceae.

Exprimarea titrului Pseudomonas aeruginosa se face prin citirea în tabelele de calcul al numărului probabil din STAS 3001/83. Tabelul VIII se va folosi pentru apele potabile ale municipiului București, plate și minerale pentru export, tabelul X pentru apele de piscine, tabelul IX pentru apele plate, minerale, răcoritoare îmbuteliate pentru uz intern și apele potabile furnizate de instalațiile centrale urbane și rurale.

## 2.4.8. Decelarea prezenței genului Salmonella

### (Metoda Institutului de Igienă și Sănătate Publică București)

Deși în STAS-ul 3001/83 de analiză bacteriologică a apei nu există încă o metodă de izolare și identificare a Salmonellelor din apă, vom prezenta mai jos în detaliu etapele metodei de izolare și identificare a salmonelelor pusă la punct și folosită cu rezultate bune în laboratorul de igiena apei din Institutul de Igienă și Sănătate Publică București



Scanned with OKEN Scanner

## MODUL DE LUCRU

Metoda de izolare și identificare a salmonelelor cuprinde 5 etape succesive, după cum urmează :

### ETAPA DE RECOLTARE ȘI CONCENTRAREA PROBELOR DE APĂ

Perniţa tip Moore, este confecţionată din tifon cu latura de 1 m, împăturit sub formă de perniţă cu lungimea de 20 cm și lățimea de 20 cm cusut, pe margini numai pe trei laturi. O latură se lasă necusută permiţînd astfel introducerea sitei suport ca într-un buzunar. Astfel fixată, perniţa se așază împreună cu sita suport în partea inferioară a pîlniei și prin ea se filtrează 100 $dm^3$ apă. Înainte de a fi folosite, pernițele sînt fiecare împachetate în hîrtie și sterilizate la autoclav.

După ce volumul de apă care ne interesează a fost filtrat, se scoate sita suport din buzunarul perniţei, iar perniţa se pune în pungă de plastic sterilă care se introduce într-o trusă frigorifică portabilă ce se aduce la laborator în maximum 6 ore. Dacă probele filtrate nu pot fi aduse în 6 ore, se păstrează la congelator, maximum 24 ore.

### ETAPA DE ÎMBOGĂȚIRE A SALMONELELOR

Cu ajutorul unei pense sterile, perniţa din punga de plastic este introdusă într-un borcan de sticlă steril de 700—1 000 $cm^3$. Peste perniţă se toarnă cu ajutorul unui cilindru gradat 300 $cm^3$ mediu de îmbogăţire-selenit de sodiu. Cu ajutorul unei baghete sterile se amestecă bine perniţa prin care s-a filtrat apa cu mediu de îmbogăţire. Se termostatează la 37°C timp de 72 ore.

### ETAPA DE DISPERSIE ȘI IZOLARE A SALMONELELOR

La 24 ore, 48 ore și 72 ore se fac subculturi cu ajutorul ansei bacteriologice, din mediul de îmbogăţire prin epuizarea ansei pe cîte două plăci cu mediu selectiv diferenţial (ADCL) pe de o parte, și pe de altă parte se fac treceri pe alte două plăci cu mediu Wilson Blair. Plăcile se termostatează la 37°C timp de 24 ore pentru cele cu mediu ADCL și timp de 48 ore pentru plăcile cu mediu Wilson Blair.

Dacă prima dispersie nu a permis izolarea de colonii pure de Salmonella, se trece la o altă însămînţare secundară pe cele două medii speciale.

Pornind de la colonii caracteristice de Salmonella care se dezvoltă pe mediul ADCL — colonii roz transparente sau semitransparente uneori cu centrul întunecat — la 24 ore de termostatare la 37°C și de la colonii caracteristice de Salmonella care se dezvoltă pe mediul Wilson Blair — colonii negre cu diametrul de 1—2 mm, turtite, aderente la mediu cu luciu și halou metalic sau mai rar, colonii mici, de culoare



Scanned with OKEN Scanner

verde-albastru — la 48 ore de termostatare la 37°C, se fac în continuare subculturi cu ansa bacteriologică fără bucle pe geloză înclinată și se termostatează la 37°C timp de 24 ore.

### ETAPA DE CONFIRMARE BIOCHIMICĂ A SALMONELELOR

Ca medii, se folosesc mediile multitest TSI-MIU/MILF. Din sectoarele plăcii Petri cu geloză nutritivă se fac treceri prin înțepare cu ansa bacteriologică dreaptă, fără buclă, în mediile multitest TSI-MIU/MILF. Se fac treceri numai din acele sectoare care au fost lactozo-negative pe mediul AABTL, care nu au invadat alte sectoare ale gelozei nutritive și care nu erau pigmentate.

*Pe mediul TSI* însămînțarea se face prin înțepare cu ansa dreaptă, în profunzimea coloanei drepte a mediului, continuînd în striuri dese descărcarea ansei pe panta mediului. După 24 ore la 37°C se citesc rezultatele. Datorită indicatorului roșu fenol și pH-ului 7,6, mediul neinoculat are o culoare roz-portocalie. Pe acest mediu sînt evidențiate următoarele proprietăți : desfacerea de tip fermentativ a glucozei — se îngălbenește coloana — producerea de gaze cu apariția de bule de aer în coloană, elaborarea de hidrogen sulfurat — înnegrirea coloanei. Partea înclinată a mediului rămîne la culoarea inițială în cazul salmonelelor, deoarece nu fermentează lactoza și zaharoza.

*Pe mediul MIU* însămînțarea se face tot prin înțepare cu ansa dreaptă în profunzimea mediului. Pe lîngă dopul de vată se introduce și o fîșie de hîrtie de filtru îmbibată cu reactiv Ehrlich pentru evidențierea indolului. După incubare la 37°C timp de 24 ore, obținem următoarele informații : coloana de mediu este opalescentă, datorită mobilității salmonelelor, și nu virează culoarea mediului din roz inițial în roșu, datorită faptului că salmonelele nu produc urează. Pe hîrtia de filtru indicator nu apare culoarea roșie-violacee, deoarece salmonelele nu produc indol.

*Pe mediul MILF* însămînțarea se face ca și la mediul MIU. Pe lîngă dopul de vată se introduce odată cu el și o fîșie de hîrtie de filtru îmbibată cu reactiv Ehrlich, pentru evidențierea indolului. După incubare 24 ore la 37°C obținem următoarele informații : în afară de mobilitate, indol, acest mediu multitest mai cuprinde și reacția lizinei și fenilalaninei. Prin faptul că mediul nu-și modifică culoarea din mov, cum este inițial, în galben, arată că salmonelele sînt capabile să decarboxileze lizina, înlăturînd gruparea carboxil-COOH acidă. Rămîn astfel grupările aminice — $NH_2$ — bazice, care alcalinizează mediul și astfel culoarea lui nu virează în galben. Salmonelele nu produc fenilalanindezaminaza. Punînd cîteva picături de clorură ferică, mediul nu virează în verde.

### ETAPA DE CONFIRMARE SEROLOGICĂ A SALMONELELOR

Identificarea serologică pe lamă, se practică folosind schema de structură antigenică a salmonelelor, Kauffmann-White, trusa de seruri diluate antisalmonella, conform indicațiilor producătorilor, notate pe eticheta fiolei și culturi tinere de 18—20 ore de pe TSI sau de pe geloză nutritivă.



Scanned with OKEN Scanner

Se lucrează numai cu colonii „S" care nu aglutinează cu serul fiziologic. Pentru aceasta se face martorul tulpinii cu care se lucrează astfel : pe o lamă se depune cu ansa o picătură de ser fiziologic steril, apoi tot cu ansa bacteriologică se încarcă bucla din cultura pură de cercetat și se emulsionează în picătura de ser fiziologic pînă se obține o opacitate lăptoasă.

Dacă tulpina aglutinează cu serul fiziologic = cultura „R" → nu se lucrează cu ea în continuare. Dacă tulpina nu aglutinează cu serul fiziologic = cultură „S" → se lucrează în continuare.

Atunci cînd tulpina de Salmonella izolată este rafizată, se recultivă în bulion, prin cîteva treceri succesive, apoi se dispersează pe o placă de agar nutritiv, alegînd o colonie „S" din care se reface cultura pură.

Pornind de la cultura „S", se trece în continuare la identificare serologică pe lamă, folosind schema următoare de lucru :

1) situarea tulpinii izolate în genul Salmonella, prin aglutinări cu ser polivalent „0" antisalmonella ;

2) cercetarea prezenței antigenului „Vi", prin aglutinare cu ser anti-„Vi". Inaglutinabilitatea sau glutinabilitatea slabă a unor tulpini prin ser polivalent „O" antisalmonella se datorează variației cantitative a acestui antigen, care atunci cînd se găsește în forma „V" face ca tulpina să fie „O" inaglutinabilă ;

3) situarea tulpinii recunoscută ca Salmonella într-unul din grupurile „O" ale schemei de diagnostic, prin aglutinări cu serurile de grup „O" (AO, BO, CO, DO, EO etc.).

4) cercetarea fracțiunilor antigenului „H" de fază specifică și nespecifică, prin aglutinări cu serurile anti-„H" și interpretarea rezultatelor după schema Kauffmann-White.

Pentru analiza bacteriologică a apei este suficientă identificarea genului Salmonella, eventual și a grupului antigenic „O" din care face parte. Prezența genului Salmonella în apă indică contaminarea ei cu germeni patogeni din genul Salmonella.

În situații epidemiologice speciale, pentru identificarea tulpinilor de Salmonella, se vor trimite tulpinile izolate la Institutul „Dr. I. Cantacuzino" — secția Enterobacteriaceae.

## ALTE METODE DE DECELARE A GENULUI SALMONELLA

Comitetul de Experți ai Oficiului Regional O.M.S. pentru Europa, recomandă atît metode calitative, cît și metode cantitative de izolare și identificare a salmonelelor în apă.

*Metoda calitativă*

*Recoltarea*

Recoltarea pentru decelarea salmonelor poate fi executată prin intermediul unui tampon de tifon (perniță Moore) scufundat într-un loc de recoltare pentru 1—4 zile sau prin intermediul unui recipient de recoltare al cărui conținut este filtrat astfel că proba recoltată este concentrată pe membrana filtrantă.

Perniția de tifon cuprinde un volum necunoscut de apă, volumul fiind dependent de curenții de apă, timpul de expunere etc.



118149

Scanned with OKEN Scanner

*Îmbogățirea*

Bacteriile colectate pe tamponul de tifon sau pe membrana filtrantă se recomandă să fie cultivate în primul rînd pe medii neselective înaintea cultivării pe medii selective. În acest scop pentru tampoanele de tifon se utilizează 300 ml bulion de preîmbogățire și pentru membranele filtrante se utilizează 100 ml bulion de preîmbogățire. Mediul neselectiv de preîmbogățire este incubat pentru 16—18 h la 37°C. Apoi, se transferă 10 ml bulion de preîmbogățire în 200 ml mediu selectiv de îmbogățire ($A_1$ sau $A_2$). Dacă se dorește în special decelarea Salmonelle typhi se recomandă mediul bulion selenit de stronțiu ($A_1$), incubat la 37°C.

Pentru examinarea mai generală a grupului Salmonella este recomandat mediul bulion tetrationat de potasiu ($A_2$).

*Cultivarea pe plăci primare*

Culturile în medii lichide de îmbogățire ($A_1$ și/sau $A_2$) sînt trecute folosind tehnica epuizării ansei pe medii solide selective ($B_1$ și/sau $B_2$ și/sau $B_3$) după 18—24 h și după 48 h de incubare. Plăcile primare sînt incubate pentru 24 h la 35—37°C. Mediul $B_2$ este de preferat pentru izolarea Salmonellei typhi.

Coloniile corespunzînd uneia din următoarele descrieri sînt suspectate ca fiind salmonele :

a) colonii roșii pe mediul $B_1$ ;

b) colonii plate cu centru negru, prezentînd un luciu metalic pe mediul $B_2$ (cîteva salmonelle pot să apară sub formă de colonii verzi fără înnegrire și luciu metalic) ;

c) colonii roz pînă la incolore pe mediul $B_3$.

*Cultivarea pe plăci secundare*

Coloniile suspecte pe plăcile primare sînt subcultivate pe plăci secundare cu mediu indicator solid (C). Coloniile care apar galbene (manitol pozitive) sînt examinate prin intermediul testelor biochimice și serologice.

Necesitățile minime pentru screening includ utilizarea bulionului lizină, bulionului ONPG, bulionului uree și bulionului indol, însămînțarea pe agar TSI și agar-sulfit de fier. Coloniile suspecte sînt testate prin aglutinarea cu serul polivalent „O".

Aglutinarea trebuie să fie efectuată utilizînd colonii de pe medii neinhibante. Dacă se dorește tiparea finală și tiparea fagică, trebuie făcută în laboratoare de referință. Problemele de diagnostic diferențial apar mai ales față de bacteriile : Citrobacter L-, Escherichia coli, Edwardsiella, Providencia, Shigella, Yersinia și Proteus.

*Examinarea cantitativă*

Examinarea semicantitativă sau cantitativă se poate efectua prin estimarea numărului probabil (MPN) utilizînd membrane filtrante corespunzătoare unor volume adesea mari de apă necesare. Volumul de apă examinat depinde de gradul de poluare (dacă este apă reziduală de canal sau apă de suprafață mai puțin poluată). Se recomandă ca membrana filtrantă să fie cultivată în mediu neselectiv (bulion de preîmbo-



Scanned with OKEN Scanner

gățire). Fiecare din culturile pe medii de preîmbogățire este apoi subcultivată în bulion selectiv de îmbogățire ($A_1$ sau $A_2$) și în continuare fiecare din culturile selective este examinată la fel ca în cazul examinării calitative a apei. Tabelele MPN utilizate pentru examinarea Escherichiei coli în apă, pot fi utilizate pentru determinarea numărului probabil (MPN) de salmonele pe 100 ml prin corectarea volumelor de apă utilizate.

## 2.4.9. Decelarea genului Shigella

În încercările de a decela Shigellele în apă s-au făcut cercetări experimentale în condiții de laborator în ceea ce privește eficiența diferitelor medii de îmbogățire, folosite cu succes pentru izolarea altor enterobacterii, ca de exemplu, Salmonella. Astfel cercetările cu mediul Rappaport pe un număr vast de tulpini, incluzînd toate tipurile de Shigella flexneri, două tipuri de Shigella boydii și tulpini de Shigella sonnei demonstrează că după o inoculare chiar abundentă, shigellele nu se multiplică, mediul dovedindu-se inadecvat pentru supraviețuirea lor. Cercetările s-au axat și pe alte două medii de îmbogățire : mediul bulion selenit de sodiu și mediul bulion de îmbogățire alcalin pentru bacterii gram negative GN (Hajna) modificat prin stabilizarea pH-ului la 8,0. Comparîndu-se aceste două medii s-a studiat și efectul perioadei de incubare (5, 9 și 15 ore) într-un model experimental în care apele de suprafață au servit ca mediu experimental contaminat cu doze relativ mici de tulpină de testat — Shigella sonnei — astfel ca densitatea să fie de circa 10 shigelle/ml. Volumul de inocul folosit dintr-o astfel de apă contaminată experimental a fost de 100 ml sau 10 ml, adăugat bulionului de îmbogățire dublu concentrat. Rezultatele au demonstrat un procent mare de decelare utilizînd bulionul GN și o perioadă de incubare de 9 ore. De asemenea, rezultatele au fost superioare cînd s-a utilizat volumul de inocul de 100 ml.

În literatura de specialitate sînt citate tehnici de decelare a genului Shigella din nămol rezidual însoțite și de determinări semicantitative prin folosirea unor volume de probă de 25, 10, 1 și 0,1 ml însămînțate în bulionul de îmbogățire GN. Probele s-au incubat 18—24 ore la 37°C, apoi s-au făcut diluții seriale din fiecare volum de îmbogățire și s-au dispersat pe plăci cu agar-xyloza-lizina-dezoxicolat. Plăcile au fost incubate la 37°C pentru 24 de ore, după care coloniile suspecte oxidazo-negative au fost transferate pe medii multitest pentru evidențierea caracterelor biochimice și identificate serologic.

În metoda elaborată de Istrati, la noi în țară pentru izolarea Shigellelor din apă, s-au utilizat cantități diferite de apă (50 ml, 100 ml, 200 ml) filtrate prin filtru Seitz pe care s-a montat pentru fiecare cantitate cîte o membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,7 microni. După filtrare membranele s-au aplicat pe un mediu selectiv în plăci Petri, iar după 20—24 ore de incubare la 37°C plăcile cu mediul selectiv, pe care s-au depus membranele filtrante s-au examinat și coloniile lactozo-negative au fost repicate și identificate.

Pe baza rezultatelor obținute în izolarea altor bacterii patogene din apă, ca de exemplu Salmonella și care au demonstrat că frecvența de



Scanned with OKEN Scanner

izolare a depins de cantitatea de probă examinată, cîțiva autori care au făcut cercetări de izolare a Shigellelor din apă au utilizat în acest scop volume de apă mai mari, precum și variate metode de concentrare, ca de exemplu, centrifugarea, filtrarea pe membrane filtrante sau prin tampoane de tifon. Astfel s-au obținut rezultate pozitive într-un focar de dizenterie prin concentrarea unor volume mai mari de apă (exemplu 11 litri) filtrate pe membrane filtrante, incubate ulterior în circa 500 ml bulion selenit de sodiu timp de 24 de ore la 37°C. La sfîrșitul perioadei de incubare s-au făcut treceri pe plăci cu medii selective ca dezoxicolat-agar sau Endo agar de pe care s-au izolat tulpini de Shigelle cu un aspect morfologic al coloniilor însă parțial diferite de al tulpinilor din scaunul bolnavilor. Folosind această metodă de decelare a Shigellelor în apă s-a demonstrat calea de transmitere a infecției cu Shigella sonnei prin apa potabilă contaminată, în paralel cu izolarea bacililor dizenterici sonnei și din scaunele indivizilor ce au consumat această apă.

Utilizînd, de asemenea, volume mai mari de apă de analizat s-a încercat și decelarea bacililor dizenterici alături de alte enterobacterii, ca salmonelele în apa reziduală din bazinele de stabilizare a stațiilor de tratare a apelor în cadrul unor studii mai vaste de evaluare a potențialului de risc. Metodele de concentrare utilizate în paralel cu centrifugarea și filtrarea pe membrane filtrante (a unor volume de circa 20 l apă), alături de tehnica imersării în apă a unor bureți celulozici, au dat rezultate pentru genul Salmonella cu procentele cele mai mari de izolare prin filtrare, însă s-au raportat mari dificultăți în izolarea Shigellelor concretizate prin faptul că nu s-a putut decela prezența membrilor genului Shigella, probabil datorită florei concurente și a fagilor specifici.

Ținînd seama de faptul că Shigelle eliminate dintr-o sursă de poluare fecală se răspîndesc inegal și sînt supuse acțiunii rapide a factorului de diluție în apă, se recomandă folosirea unui volum de 100 $dm^3$ apă de cercetat prin tehnica filtrării (vezi metoda Institutului de Igienă și Sănătate Publică București de decelare a Salmonellelor), recoltat cît mai aproape de deversarea sursei de poluare.

Se recomandă, de asemenea, folosirea filtrării apei prin pernițele de tifon cu mediu de îmbogățire GH timp de 18—24 de ore la 37°C, urmată de treceri pe mediul ADCL incubat timp de 24 de ore la 37°C. Coloniile izolate suspecte se repică în mod obligatoriu pe următoarele medii : mediul AABTL în sector și medii politrope : TSI, MIU/și MILF, ultimele cu bandă pentru indol.

În cazul în care culturile pe mediile politrope prezintă caracteristicile biochimice specifice Shigellelor : fermentarea glucozei fără producere de gaz (excepție unele biotipuri de Shigella flexneri), nu fermentează lactoza (excepție Shigella sonnei care fermentează tardiv lactoza), nu produc hidrogen sulfurat, sînt imobile, sînt indol variabile, sînt ureazo-negative, nu decarboxilează lizina, nu produc acid fenilpiruvic din fenilalanină, ele se rețin pentru identificarea serologică prin aglutinare pe lamă cu trusa de seruri antishigella. Dacă cultura dezvoltată pe mediile politrope prezintă caracterele biochimice de Shigella, dar se comportă negativ, la aglutinare cu seruri antishigella se procedează la reexaminarea aglutinabili-



Scanned with OKEN Scanner

tăţii după termoinactivare (100°C — timp de 1 oră), pentru înlăturarea unor eventuale antigene de suprafaţă termolabile. Dacă şi după acest tratament aglutinarea rămîne negativă, se trimite tulpina pentru identificare la laboratorul de referinţă din Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

## 2.4.10. Decelarea prezenţei vibrionilor holerici de grup 0 : 1 şi vibrionilor holerici de grup non 0 : 1

Decelarea prezenţei speciei Vibrio cholerae de grup 0 : 1 în apă poate fi cerută în legătură cu stabilirea etiologiei unor focare epidemice şi pentru evaluarea prezenţei unor bacterii enterice patogene.

*Examinarea calitativă a apei* cuprinde următoarele etape :

a) Cultivarea în bulion selectiv de îmbogăţire a tampoanelor de tifon sau membranelor filtrante corespunzătoare volumelor de apă dorite. Poate fi utilizat un bulion de îmbogăţire dublu concentrat sau de 10 ori mai concentrat. Un astfel de bulion va reveni la concentraţia normală după adăugarea unui volum corespunzător de probă de apă de examinat.

b) Subcultivarea din mediul selectiv de îmbogăţire pe plăci cu mediu selectiv.

c) Izolarea în cultură pură a coloniilor suspecte, utilizînd medii neselective.

d) Screeningul coloniilor suspecte cu ajutorul testelor serologice şi anumitor teste biochimice.

e) Expedierea tulpinilor suspecte la laboratoarele specializate pentru tiparea finală biochimică-serologică şi tiparea fagică pentru a diferenţia Vibrio cholerae de grup 0 : 1, biotip cholerae şi biotip ElTor şi Vibrio cholerae de grup non 0 : 1.

Substanţele chimice care pot fi adăugate mediilor pentru a obţine selectivitatea dorită sînt următoarele : taurocholat, telurit, citrat, alkyl-aryl-sulfonat, tiosulfat. Un efect selectiv în medii lichide şi solide poate fi de asemenea, obţinut prin menţinerea mediilor alcaline (maximum pH 9,2).

*Recoltarea*

Recoltarea apei pentru Vibrio cholerae de grup 0 : 1 şi vibrioni holeri de grup non 0 : 1 poate fi executată prin intermediul tampoanelor de tifon suspendate la locul de recoltă pentru 24—48 h sau cu ajutorul recipientelor de recoltare. Tampoanele de tifon reprezintă în acest caz un volum necunoscut de apă, volumul fiind dependent de curenţii de apă şi timpul de expunere. O altă variantă o reprezintă filtrarea pe teren a unui volum de cca 100 $dm^3$ apă printr-o perniţă de tifon, metodă de filtrare care poate folosi pentru cercetarea vibrionilor holerici în apele slab contaminate. Probele recoltate în recipiente pot fi concentrate pe membrane filtrante (ape lipsite de turbiditate) permiţînd membranelor să reprezinte adesea volume mari de apă necesare pentru decelarea vibrionilor holerici. Poate fi utilizată examinarea probelor de apă din flacoanele de recoltă cu ajutorul bulionului de îmbogăţire dublu concentrat sau de 10 ori mai concentrat, ce prin adăugarea volumului de apă corespunzător recoltat, este adus la concentraţia normală cu corectarea pH-ului la valoarea 9,2.



Scanned with OKEN Scanner

Se recomandă pentru obținerea de rezultate pozitive, combinarea metodei filtrării (cu tampon suspendat la locul recoltei 24—48 h sau filtrarea direct în teren a unui volum de apă de cca 100 $dm^3$) cu recoltarea unui volum de apă. În acest caz se introduce tamponul sau pernița după ce se scurge surplusul de apă în flacoane de recoltă de 1 $dm^3$ cu gura largă conținînd 100 $cm^3$ mediu selectiv de îmbogățire de 10 ori mai concentrat, la care se adaugă pînă la gura flaconului proba de apă de examinat, urmată de creșterea, la locul recoltei a pH-ului la valoarea 9,2

*Îmbogățirea*

Tampoanele de tifon sau membranele filtrante sînt incubate pe medii de cultură selective lichide ($A_1$ și/sau $A_2$), îmbogățirea primară pentru 6—8 h la 35—37°C după care se execută însămînțarea prin procedeul dispersiei pe medii solide selectiv-diferențiale. O alternativă o reprezintă repetarea îmbogățirii prin inocularea din mediu de îmbogățire selectiv $A_1$ sau $A_2$ din văl sau de la suprafață într-un nou bulion selectiv de îmbogățire, realizînd îmbogățirea secundă, urmată de subcultivarea pe plăcile cu medii solide selective.

*Cultivarea pe medii selective solide*

Pentru cultivarea pe plăci cu medii solide selective și diferențiale se recomandă utilizarea în paralel a cîte unui mediu din fiecare tip slab inhibant $B_1$, $B_2$ și inhibant $B_3$, $B_4$, iar plăcile însămînțate prin procedeul dispersiei se incubează la 35—37°C pe durate variabile (12—24 h., în funcție de calitățile inhibante ale mediului, de regulă pînă a doua zi, 18 h.). Utilizarea mediilor slab inhibante $B_1$ sau $B_2$ presupune o dublă citire, dintre care prima după 12 h., iar cea de-a doua după 18 h. de incubare, identificîndu-se coloniile suspecte după caracteristicile următoare : transparență sau halo-ul opac.

În eventualitatea folosirii în paralel a mediilor inhibante $B_3$ sau $B_4$, dezvoltarea mai lentă a coloniilor impune efectuarea citirii după cel puțin 18 ore de incubare la 35—37°C, coloniile suspecte prezentîndu-se sub formă de :

a) colonii plate, galbene cu un diametru de 2—3 mm pe mediul $B_3$ sau,

b) colonii gri cu centrul negru înconjurate de un halou și 1,5—5 mm diametru după 48 ore de incubare pe mediul $B_4$.

După 48 de ore o colonie de Vibrio cholerae poate atinge 2—4 mm diametru ; apare un centru negru și se produc schimbări zonale (dezvoltarea unui halou în jurul coloniei).

Din colonia sau coloniile suspecte dezvoltate pe mediile mai puțin inhibante $B_1$ sau $B_2$ se ridică cu vîrful acului bacteriologic o cantitate mică pentru efectuarea testului oxidazei (folosind benzi de hîrtie impregnate cu soluție 1% de clorhidrat de tetrametil parafenilen diamină) reținîndu-se numai colonia sau coloniile oxidazo-pozitive. Din colonia suspectă oxidazo-pozitivă se însămînțează cu acul bacteriologic un tub cu apă peptonată (1—2 ml.) care se incubează la 37°C astfel ca după 2—3 ore să existe suficientă cultură pentru efectuarea identificării. Tot din colonia suspectă se efectuează aglutinarea pe lamă cu serul bivalent antiholeric de grup 0 : 1.



Scanned with OKEN Scanner

Din colonia sau coloniile suspecte dezvoltate pe mediile mai inhibante $B_3$ sau $B_4$ se însămînțează cu acul bacteriologic un mediu politrop tip TSI ce se incubează la 37°C pînă a doua zi, un tub cu geloză înclinată pentru fiecare colonie suspectă (sau un sector dintr-o placă Petri cu geloză nutritivă), ce se incubează 18 ore la 37°C și eventual dacă este posibil, se însămînțează un tub cu apă peptonată (1—2 ml.), din care după o incubare de 2—3 ore la 37°C se pot efectua testele de identificare.

Din cultura dezvoltată după incubarea timp de 2—3 ore la 37°C a tubului cu apă peptonată (1—2 ml.) în care s-a repicat colonia suspectă, se efectuează însămînțările necesare identificării :

— însămînțarea mediului Hugh-Leifson cu glucoză (test O-F) ;
— însămînțarea seriei minimale cu zaharuri :
  • glucoză (cu tub tip Durham pentru captarea gazului)
  • lactoză
  • manoză
  • zaharoză
  • arabinoză
  • manită
  • inozită
— însămînțarea mediului Möller cu :
  • lizină
  • arginină
  • ornitină
  • a martorului fără aminoacid
— însămînțarea (o picătură sau o ansă plină) : pe o placă Petri cu agar gelatină (cînd nu se lucrează cu mediile $B_2$ sau $B_4$) ;
— însămînțarea apei peptonate pentru testarea capacității indologene ;
— însămînțarea mediului Clark-Lubs (testarea producerii de acetoină) ;
— însămînțarea unui tub cu geloză nutritivă înclinată pentru reverificarea aglutinării cu serul de grup 0 : 1.

Rezultatele însămînțărilor pe TSI se citesc a doua zi, se triază tuburile (coloniile) reținîndu-se pentru studiu numai cele ce prezintă reacții tipice : fermentarea fără gaz a glucozei, fermentarea sau absența fermentării zaharozei, absența fermentării lactozei de regulă, absența producerii de $H_2S$, iar din cultura corespondentă dezvoltată pe geloză nutritivă (tub sau sector) se execută reacția oxidazei și aglutinarea pe lamă cu serul bivalent de grup 0 : 1. Identificarea certă necesită efectuarea în continuare a testelor biochimice mai sus menționate.

Este de menționat că manevra de însămînțare din colonia suspectă trebuie să fie executată corect, pentru a asigura puritatea inoculului. Nu se recomandă testarea prezenței oxidazei și a antigenului 0 : 1 (aglutinarea pe lamă) din colonia sau coloniile dezvoltate pe medii inhibante ca $B_3$ pentru că prezența carbohidratului din mediu poate determina reacții fals pozitive pentru testul oxidazei, iar pe de altă parte substanțele inhibante din mediu pot determina inaglutinarea coloniei (reacție fals negativă).

Hemoliza pe geloză sînge (sînge de oaie) poate da o indicație asupra biotipului.



Scanned with OKEN Scanner

Tulpinile diagnosticate ca Vibrio cholerae pe baza testelor biochimice și serologice trebuie trimise la laboratorul de referință din Institutul „Dr. I. Cantacuzino". Toate tulpinile care biochimic seamăn cu Vibrio cholerae, dar nu aglutinează cu serul de grup 0 : 1 trebuie, de asemenea, să fie trimise la laboratorul de referință.

Diagnosticul diferențial legat de examinarea probelor de apă pentru Vibrio cholerae se face în special cu bacteriile sucrozo-pozitive care se dezvoltă pe plăcile selective. Bacteriile de acest fel sînt : Vibrio anguillarum, Vibrio alginolyticus, cîțiva Vibrio parahaemolyticus, alți vibrioni și specii de Proteus. Vibrionii holerici de grup non 0 : 1 pot ușor fi luați drept Vibrio cholerae grup 0 : 1 și vice-versa. Prin urmare, aglutinarea cu ser de grup 0 : 1 trebuie de regulă să fie efectuată și cu culturi fierte, dacă testul normal de aglutinare este negativ.

## 2.4.11. Decelarea prezenței speciei Yersinia enterocolitica

Metodele în mod curent utilizate pentru izolarea din mediul acvatic a Yersiniei enterocolitica au fost lipsite de specificitate și au necesitat frecvent perioade lungi de incubare.

Mediile obișnuite pentru diagnosticarea enterobacteriaceelor au fost adesea utilizate în încercarea de a izola microorganismul și singura informație diferențială furnizată de multe dintre aceste medii a fost determinarea fermentării lactozei, o serie de teste suplimentare trebuind să fie efectuate înainte de a face identificarea. Tehnicile de însămînțare la rece s-au arătat de ajutor în recuperarea microorganismului, bazate pe capacitatea speciei de a crește la temperaturi apropiate de refrigerare (0—5°C) utilizate pentru a păstra alimentele perisabile.

Este cunoscut faptul că inhibiția creșterii speciei Yersinia enterocolitica de către alte bacterii gram negative în culturi mixte la 32°C nu este consecința epuizării substanțelor nutritive esențiale din mediu, unei schimbări nefavorabile a pH-ului, tensiunii de oxigen sau producerii de metaboliți toxici, ci incapacitatea speciei Yersinia enterocolitica de a atinge potențialul maxim al populației mixte pare să rezulte din aglomerarea metabolică care se produce cînd microorganismele crescînd rapid ajung în faza de densitate staționară. Scăderea temperaturii de incubare sau îmbogățirea „la rece" pentru izolarea speciei Yersinia enterocolitica tinde să egalizeze rata de creștere și astfel să-i permită să realizeze o populație mare. Tehnica îmbogățirii „la rece" necesită însă cîteva zile sau săptămîni de incubare. Durata perioadei de incubare este condiționată de cantitatea inoculului de contaminare inițială, și de tipul de bulion de îmbogățire utilizat.

Alți cercetători au încercat să utilizeze tehnicile de îmbogățire la cald cu perioade scurte de incubare.

Ca medii de îmbogățire se poate folosi bulionul sorbitol + săruri biliare modificat prin adăugarea a 0,5% peptonă.

O cercetare comparativă s-a efectuat între creșterea speciei Yersinia enterocolitica în bulion sorbitol + săruri biliare și bulion cu peptonă + sorbitol + săruri biliare. Incubarea la 22°C pentru 48 h a demonstrat o mai



Scanned with OKEN Scanner

bună creștere în bulion cu peptonă + sorbitol + săruri biliare și prin acest procedeu de îmbogățire izolarea speciei din apele dulci și marine a fost semnificativ ameliorată.

O altă tehnică utilizată este tehnica membranei filtrante diferențiale pentru izolare. O astfel de tehnică se bazează pe :

— recoltarea unor volume mari de apă (100 l) ;

— o reducere substanțială a numărului de colonii care trebuie supuse screeningului prin izolarea microorganismului ;

— o reducere a perioadei de timp necesare pentru izolare și identificare ;

— recuperarea sigură a tulpinilor din mediul acvatic.

După filtrarea probei, membrana filtrantă (cu mărimea porilor de 0,45 μm și 47 mm ∅) este plasată pe un suport absorbant de celuloză saturat cu 2 ml de bulion de îmbogățire și introdusă în plăci Petri care se incubează pentru 48 ore la 25°C.

O a doua modalitate este reprezentată de plasarea directă a membranei filtrante, după efectuarea filtrării, pe suprafața agarului nutritiv pentru Yersinia enterocolitica, turnat în plăci Petri, care apoi se întorc și se incubează 48 h la 25°C.

Yersinia enterocolitica care fermentează sorbitolul apare sub formă de colonii galbene pînă la galben oranj cu dimensiunea cuprinsă între 0,3—1 mm ∅ și cu o predominanță a colonilor mari. Coloniile mici aglomerate, adesea sînt incolore cu centrul galben pînă la galben brun. După incubarea inițială, membranele filtrante sînt transferate pe mediul agar-lizină-arginină și incubate pentru 1 h la 35°C în condiții de anaerobioză. Prelungirea perioadei de incubare nu furnizează o sensibilitate mai mare și poate da reacții fals pozitive a coloniilor incolore. Plăcile sînt incubate apoi la temperatura camerei pentru încă 1—2 minute pentru a intensifica reacțiile biochimice de culoare a coloniilor pozitive. Coloniile devin galben strălucitoare pînă la galben oraj cînd sînt observate în lumina fluorescentă. Coloniile microorganismelor dînd dovadă de activitate față de unul sau ambii aminoacizi apar albastre, verzi sau galben-verzui. Cercetarea ureazei este efectuată imediat după cercetarea lizinei și argininei prin transferarea membranei filtrante pe un suport absorbant saturat cu 2 ml bulion pentru decelarea ureazei. După 5—10 minute, perioadă de incubare la temperatura camerei, coloniile de Yersinia enterocolitica își schimbă culoarea de la galben la un verde acentuat sau albăstrui-purpuriu intens, indicînd activitatea ureazei. Coloniile decelate la sfîrșitul perioadei de incubare de 5/10 minute, de culoare verde sau albastră, reprezintă acele microorganisme care sînt sorbitol pozitive, lizină și arginină negative, uree pozitive.

Aceste teste utilizate sînt de bază pentru identificarea biochimică prezumtivă a Yersiniei enterocolitica.

Schema de lucru pentru tehnica membranei filtrante :

1) Filtrarea probei de apă, așezarea membranei pe suportul din celuloză îmbibat în bulion de îmbogățire, incubarea la 25°C pentru 48 h.

2) Plasarea membranei pe mediu agar-lizină-arginină și incubarea în anaerobioză la 35°C pentru 1 h.

3) Plasarea membranei în bulion uree.



Scanned with OKEN Scanner

4) Repicarea coloniilor verzi pînă la albastru intens.
(urează +)

5) Yersinia enterocolitica prezumtiv identificată.

O altă tehnică o constituie însămînțarea pe plăci cu agar dezoxicolat-citrat-manitol. Un tapon steril este îmbibat în proba de apă și însămînțat pe plăci. După uscarea inoculului plăcile sînt întoarse și incubate în anaerobioză timp de 72 h la 25°C. Coloniile care se prezintă sub formă de colonii rotunde, purpuriu colorate și fără consistență mucoasă sînt subcultivate pe plăci cu agar-dezoxicolat-citrat-manitol și incubate în aerobioză la 25°C timp de 48 h.

Problema majoră o constituie diferențierea speciei Yersinia enterocolitica de Enterobacteriaceae competitive. Un număr de astfel de bacterii competitive a fost inhibat în 48 pînă la 72 h de incubare în condiții anaerobe, în timp ce caracteristicile morfo-tinctoriale ale speciei Yersinia enterocolitica au fost păstrate.

Cîteva microorganisme competitive au prezentat caracteristici morfo-tinctoriale similare cu acelea ale speciei Yersinia enterocolitica. Acestea au fost eliminate prin subcultivarea coloniilor suspecte pe același mediu și incubarea pentru 24—48 h la 25°C în condiții aerobe.

Doar Yersinia enterocolitica își păstrează morfo-tinctorialitatea tipică prin incubare aerobă și anaerobă.

Alți autori constată că mediul agara celobioza-lizină pentru izolarea speciei Yersinia enterocolitica este superior altor medii.

După 48 h pînă la 72 h de incubare la 28°C coloniile roșii rubinii de Yersinia enterocolitica au putut fi ușor distinse de coloniile incolore ale microorganismelor ce nu descompun celobioza. Dificultăți s-au întîlnit doar la diferențierea între Yersinia enterocolitica și Serratia marcescens necesitînd în plus identificarea biochimică și serologică.

Incapacitatea Yersiniei enterocolitica, comparativ cu cele mai multe Enterobacteriaceae, de a reduce clorații la cloriți toxici, a îngăduit realizarea unui mediu (C) ce conține 0,08% clorat de potasiu și 1% sorboză, asociat cu o incubare în condiții de anaerobioză timp de 48 h și de următoarele 24 h de incubare aerobă. Pe acest mediu coloniile roșii de Yersinia enterocolitica rezultate din fermentarea sorbozei sînt ușor recunoscute și multe specii de enterobacteriaceae sînt inhibate.

O altă tehnică, care se poate folosi, este tehnica de inoculare în bulion glucozat incubat în anaerobioză, urmat de trecerea pe plăci cu agar Mc Conkey suplimentat cu Tween 80, incubate, de asemenea, în anaerobioză.

O metodă simplificată de izolare a speciei Yersinia enterocolitica din apele de suprafață este reprezentată de tehnica de îmbogățire în mediul alcalin bazată pe toleranța față de soluții alcaline diluate. Metoda necesită tampoane sterile Moore scufundate într-un curs de apă pentru 48 h și apoi imersate într-o cantitate de cîte 1 l bulion de îmbogățire peptonă-sorbitol-săruri biliare și incubate la 26°C pentru 72 h.

După incubare 1 ml bulion se transferă în 9 ml soluție 0,5% NaOH în 0,5 NaCl. Două anse din acest amestec se trec pe plăci cu agar Mc Conkey și se incubează la 26°C pentru 48 h. În cazul creșterii, se iau 2 colonii tipice de pe fiecare placă de agar selectiv pentru efectuarea testelor biochimice.



Scanned with OKEN Scanner

Coloniile tipice sînt convexe, translucide și slab colorate în roz, de circa 1—2 mm diametru cu margini netede bine conturate. După obținerea în cultură pură, tulpinile trebuie testate biochimic pe următoarele medii : TSI, MIU, MILF și citrat Simmons, recomandate pentru identificarea biochimică a genului Yersinia.

Următoarele teste se utilizează ca și criterii de identificare : fermentarea glucozei, lipsa de gaz, mobilitatea la 26°C, imobilitatea la 37°C, absența $H_2S$, absența creșterii pe citrat Simmons și absența lizin și arginin decarboxilazei. Aceste rezultate se obțin prin incubarea la 26°C timp de 48 h.

## 2.4.12. Decelarea prezenței genului Camphylobacter

Deși cîteva rapoarte au descris izolarea microorganismului Camphylobacter jejuni din apă, este evident că pentru a studia prezența lui în apă sînt necesare metode mai bune de concentrare din volume mari de apă.

Utilizînd metoda membranei filtrante s-au izolat microorganisme din genul Camphylobacter din apa de mare și specii de Camphylobacteri termofile din apa de rîu. Pe lîngă metoda membranei filtrante s-au utilizat tehnica de îmbogățire sau o combinare a membranei filtrante și îmbogățirii. Ca medii de îmbogățire sînt recomandate : bulion Preston, bulion Brucella, bulion tioglicolic suplimentat cu 0,16% agar și un amestec selectiv de antibiotice și eventual sînge, bulion Oosterom modificat etc. Ele se incubează la 42°C peste noapte, iar pentru trecerea pe medii selective se recoltează cu ansa sau cu o pipetă Pasteur, materia din zona situată la 2 cm sub suprafața mediului.

Tampoanele de tifon nu s-au utilizat inițial pentru izolarea genului Camphylobacter din apă. Moore le-a utilizat pentru prima oară pentru izolarea de Salmonella spp. din apa reziduală de canal, iar ulterior au fost folosite pentru izolarea speciei Vibrio cholerae din ape reziduale. Pentru pregătirea tampoanelor Moore o bucată de tifon (60 pe 15 cm) se împăturește de cîteva ori pentru a forma un sul compact cilindric care se leagă în centru cu un fir de nylon pentru a asigura menținerea tamponului la locul de recoltare.

Tampoanele se împachetează în hîrtie groasă, se autoclavează și se păstrează în pungi de plastic pînă în momentul utilizării.

Spira a pus la punct o tehnică similară de filtrare prin tifon, eficientă și ieftină care a fost, de asemenea, utilizată pentru izolarea lui Vibrio cholerae din apă. Un flacon de plastic de 450 ml cu o gaură de 2 cm tăiată la fund se utilizează ca suport pentru tamponul Spira. Bucata de tifon se introduce în flacon pînă ce devine compactă și totuși compresibilă.

S-au făcut cercetări în ceea ce privește izolarea lui Camphylobacter jejuni din apele de suprafață prin evaluarea a patru metode :

— tehnica membranei filtrante cu trecerea direct pe plăci cu agar pentru Camphylobacter ;
— tehnica membranei filtrante cu bulion de îmbogățire ;
— tehnica filtrării cu tampon Moore ;
— tehnica filtrării cu tampon Spira.



Scanned with OKEN Scanner

Se pot folosi membrane filtrante cu mărimea porilor de 0,45 μm, utilizarea lor depinzînd de cîțiva factori ca : volumul probei de examinat, turbiditatea apei, nivelurile suspectate de contaminare cu Camphylobacter, de utilizarea unei tehnici de îmbogățire a membranei filtrante. În stadiul actual de izolare a speciei Camphylobacter jejuni din apă, o procedură de îmbogățire selectivă poate fi necesară pentru a reduce numărul de microorganisme competitive. S-a demonstrat că plasarea membranelor filtrante într-un mediu de îmbogățire, o modificare a mediului Oosterom nu mărește izolarea de Camphylobacter jejuni, comparativ cu plasarea membranelor direct pe plăci și în plus, prelungește identificarea prezumtivă cu încă 24 h. Tehnica membranei filtrante cu bulion de îmbogățire Oosterom modificat s-a dovedit mai sensibilă pentru izolarea speciei Camphylobacter jejuni decît tamponul Moore sau Spira în condiții experimentale de laborator, dar a dat rezultate similare cu acelea a tampoanelor Spira cînd s-a utilizat pentru evaluarea contaminării apelor de suprafață. Aceste rezultate indică faptul că membrana filtrantă ca și filtrarea prin tampon, sînt tehnici eficiente pentru testarea apei de suprafață, utilizarea tamponului Spira oferă avantajul unui echipament ieftin, în timp ce membrana filtrantă este probabil tehnica cea mai sensibilă. În plus, membranele filtrante nu necesită utilizarea unui mediu de îmbogățire, fiindcă ele pot fi plasate direct pe plăcile cu agar selectiv pentru Camphylobacter jejuni.

Ca mediu de bază se folosește o geloză nutritivă, bogată în substanțe nutritive suplimentată cu sînge de berbec, sau de cal, la care se adaugă un amestec selectiv de antibiotice. Pot fi utilizate următoarele medii : mediul Skirrow, mediu Butzler, mediul Preston, mediul Campy I.C.

În ceea ce privește necesitățile de $O_2$ și $CO_2$, bacteriile din genul Camphylobacter sînt inhibate în creșterea lor de $O_2$ în concentrația din aerul atmosferic (21%), necesitînd în schimb o concentrație mai mare de $CO_2$. S-a demonstrat că microaerofilia acestor germeni este cel puțin în parte cauzată de incapacitatea de a sintetiza compuși ce leagă fierul la nivele suficiente pentru a suporta creșterea aerobă. Astfel, introducerea în mediu a unui amestec format din piruvat de sodiu, metabisulfit de sodiu și sulfat de fier, fiecare în concentrație de 0,025% (amestec FBP), duce la creșterea aerotoleranței pentru toate speciile microaerofile. Cercetările experimentale au dovedit că cele mai bune condiții de microaerofilie sînt obținute de o atmosferă de 5—7% $O_2$, 8—10% $CO_2$ și 85% $N_2$. Printre modalitățile de a realiza o atmosferă microaerofilă corespunzătoare sînt vase din sticlă pentru vid și tuburi cu amestec optimal, vase ermetice cu kituri anaerocult C, metoda cu lumînarea, incubarea în concentrații mai mari de $CO_2$, însămînțarea concomitentă a unui germen anaerob facultativ care consumă o parte din $O_2$, utilizarea de pungi de plastic în care se introduc plăcile, iar atmosfera microaerofilă se realizează prin insuflarea de $CO_2$ sau generarea de $CO_2$ prin reacție chimică după care pungile se închid ermetic. Amestecul FBP poate crește uneori aerotoleranța pentru $O_2$ pînă la 10—12%. Microaerofilia este mai accentuată la prima izolare, însă prin pasaje toleranța față de $O_2$ crește, germenii putînd fi cultivați și în concentrații de 15—17% $O_2$ realizabile prin metoda lumînării.

Temperatura optimă de incubare pentru Camphylobacter jejuni/coli este de 42—43°C cu o perioadă de incubare de 48 h în medie, dar pentru



Scanned with OKEN Scanner

pasajele ulterioare, se poate folosi și temperatura de 37°C. Atît Camphylobacter jejuni, cît și Camphylobacter coli nu cresc la 25°C.

Aspectul cultural : coloniile de Camphylobacter jejuni/coli apar sub două forme :

— colonii rotunde convexe, netede cu margini regulate, de 1—2 mm ∅ de culoare gri-castaniu ;

— colonii umede cu tendință de a se întinde de-a lungul striului (seamănă cu picături de miere).

Testul oxidazei și morfologia catalazei se pot practica direct din cultura originală. Aspectul caracteristic al coloniilor, prezența oxidazei și catalazei în condițiile unei incubări microaerofile la 42—43°C pot conduce la diagnosticul prezumtiv de Camphylobacter jejuni/coli realizabil în 48 h.

Alte teste de confirmare defintivă sînt :

— reducerea nitraților
— producerea $H_2S$ pe mediul TSI
— creșterea în bulion cu 1% glicină ca unică sursă de C și N
— hidroliza hipuratului
— nu fermentează sau oxidează carbohidrații
— susceptibilitatea la acid nalidixic — sensibili
  la cefalotin (discuri de) (30 mcg.) (antibiotic) — rezistenți

Camphylobacter coli se diferențiază de Camphylobacter jejuni prin incapacitatea de a hidroliza hipuratul.

În concluzie, pentru decelarea genului Camphylobacter din apă, se recomandă folosirea tehnicii de izolare din volume mari de apă (100 l), prin filtrare pe pernițe de tifon (Moore) cu îmbogățire și treceri ulterioare pe medii selective pentru Camphylobacter.

## 2.4.13. Decelarea prezenței speciei Legionella pneumophila

Legionella pneumophila fiind izolată din numeroase medii acvatice, frecvența foarte mare a prezenței acestei specii sugerează că factorul limitativ constă din sensibilitatea tehnicii de izolare mai mult decît din existența în natură a speciei Legionella pneumophila. Primele încercări de a izola Legionella pneumophila din mediu au fost realizate prin inocularea la cobai și oul embrionat de găină, care sînt tehnici de laborator laborioase. Mai recent, multe laboratoare au obținut succese în izolarea legionelelor practicînd izolarea directă pe medii de cultură după o concentrare prin centrifugare sau filtrare.

Probele de apă pentru izolarea speciei Legionella pneumophila trebuie recoltate în vase sterile, chimic inerte, păstrate la rece.

Există două metode principale de izolare pentru Legionella :

a) decelarea directă utilizînd tehnica imunofluorescenței directe și însămînțărilor pe medii de cultură ;

b) decelarea biologică prin inoculare la cobai.



Scanned with OKEN Scanner

## TEHNICA IMUNOFLORESCENȚEI DIRECTE

Screeningul probelor de apă se face prin tehnica de imunofluorescență directă pentru a le determina pe acelea care conțin bacterii ce se colorează fluorescent cu anticorpii antilegionella marcați cu isotiocianat de fluorsceină și în consecință pentru a stabili din care probe este mai probabil să crească Legionella pneumophila, cînd se cultivă pe medii speciale. Se prepară frotiuri pe lame din probele de apă. Colorarea lamelor se face cu conjugatele fluorescente specifice din Legionella, se lasă lamele să se usuce, se fixează slab prin căldură și apoi cu 10% formalină.

## IZOLAREA PRIMARA A SPECIEI LEGIONELLA PNEUMOPHILA PE MEDII NUTRITIVE

Se pregătesc probe de apă pentru cultivarea directă pe medii făcînd diluții decimale pînă la $10^{-4}$ în apă distilată sterilă. Volume de inocul (0,1 ml) din proba de apă nediluată și din fiecare diluție sînt însămînțate cu ansa bacteriologică pe sectoare de pe plăci cu medii de izolare I și II și dispersate apoi cu baghete de sticlă sterile. Plăcile se incubează la 35°C în atmosferă cu umiditate 70—80% cu adaus de 2,5% $CO_2$. Se examinează zilnic plăcile pentru creștere. După 2—3 zile de incubare, se calculează valoarea UFC (unități formatoare de colonii) pentru cultura de pe fiecare mediu și se înregistrează rezultatele după cum urmează :

— creștere rară $10^4$ UFC/ml
— creștere medie $10^4$—$10^6$ UFC/ml
— creștere densă $10^6$ UFC/ml

Se utilizează densități calculate microbiene de UFC pentru fiecare probă de apă ca un ghid pentru a determina cantitățile de probă de apă ce trebuie inoculate la cobai. Plăcile se examinează 3 zile și apoi zilnic pentru dezvoltarea coloniilor ce pot prezenta caracteristici pentru Legionella pneumophila.

Coloniile de Legionella apar obișnuit în timp de 4—7 zile. Cu toate acestea se incubează plăcile ce nu prezintă creștere, în continuare pînă la 14 zile, înainte de a fi eliminate ca negative.

*Examinarea plăcilor.* Plăcile cu agar I se observă macroscopic, cu o lampă, permițînd luminii să treacă prin agar. În zonele cu inocul bogat de pe placă, cultura confluentă este vizibilă în 2—3 zile și apare sub formă de pigmentație brună a coloniilor și agarului din jur. În zonele cu inocul sărac, coloniile de Legionella pneumophila pot să apară în 4—5 zile, mai întîi punctiforme albicioase. Aceste colonii cresc mai mari după o inoculare mai lungă, convexe, cenușii cu ∅ de 3—4 mm. Se examinează creșterea abundentă și la întuneric, în lumina ultravioletă de 366 nm.

Fluorescența poate fi observată în 4—5 zile de creștere. Coloniile se examinează cu lupa la o sursă de lumină laterală și oblică. Coloniile de Legionella pneumophila trebuie să aibă o textură lucioasă-sticloasă caracteristică.

Plăcile cu agar II se examinează la fel ca cele cu agar I. Coloniile apar în 3 pînă la 5 zile și au aspect lucios-sticlos, mai puțin pronunțat, care și dispare după incubare suplimentară.



Scanned with OKEN Scanner

## IDENTIFICAREA PREZUMTIVĂ A COLONIILOR DE LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Se însămînțează coloniile cu aspectele mai sus menționate pe ambele medii speciale penrtu cultivare și pe un alt mediu de cultură convențional (de exemplu, geloză sînge ce nu conține L-cisteină) și se incubează mediile la 35°C în atmosferă cu un adaus de 2,5% $CO_2$. Se examinează plăcile zilnic pentru creștere. Se testează toate culturile care cresc pe agar I și II, dar nu pe geloza sînge. Culturile care cresc pe geloză sînge nu sînt de Legionella pneumophila.

O altă metodă care se poate folosi în cazul probelor de apă constă în filtrarea unui volum mare de apă (100 litri), spălarea membranei filtrante, centrifugarea lichidului și cercetarea sedimentului, așa cum s-a menționat mai sus. În cazul unei probe puternic contaminate este utilă, înainte de însămînțare, pretratarea cu un tampon acid (0,2 M HCl—KCl pH = 2,2 timp de 1 minut) sau prin încălzire (la 60°, 1—2 minute sau la 50°C, 30 minute), pentru reducerea florei asociate. Se mai poate folosi procedeul de îmbogățire negativă prin care proba se amestecă în volum egal cu bulion de digestie triptică conținînd 2 ml % dintr-un amestec de Colistin 75 µg/ml, Nistatin 125 µg/ml și Vancomicină 30 µg/ml. Se incubează la 22°C timp de 8 ore, timp în care flora asociată de contaminare se reduce foarte mult și se însămînțează apoi pentru izolarea legionelelor pe medii speciale sau selective.

A fost descrisă recent o metodă pentru identificarea prezumtivă a speciei Legionella pneumophila prin formarea de colonii satelite în jurul discurilor de hîrtie de filtru impregnate cu pirofosfat feric și L-cisteină pe un mediu bazal. Această tehnică simplifică diferențierea coloniilor repicate de Legionella pneumophila de alte microorganisme din culturile mixte-ale probelor de mediu.

## IZOLAREA PRIMARĂ PRIN METODA BIOLOGICĂ

Deși procedurile pe cobai sînt laborioase și obositoare, pentru izolarea speciei Legionella pneumophila, specialiștii nu au găsit încă o alternativă satisfăcătoare pentru analiza probelor de apă. Rezultatele testelor directe de imunoflorescență (efectuate cu conjugate fluorescente, polivalente de amestec, conținînd mai multe serotipuri) indică probele care conțin mai probabil Legionella pneumophila cînd s-au testat mai departe. Probele de apă sînt frecvent mai contaminate cu altă microfloră după cum am arătat, încît dacă un cobai este inoculat cu o cantitate mare de floră microbiană, animalul probabil moare din alte cauze decît a unei infecții cu Legionella pneumophila. Ca urmare, este important să se evalueze concentrația florei de asociație din probe, cînd se alege inoculul pentru cobai. Acest lucru se realizează curent prin cultivare. Alte metode pentru estimarea densității microbiene a florei, exceptînd Legionella pneumophila sînt : observarea directă la microscop a lamelor folosind colorația Gram și cultivarea florei microbiene pe plăcile cu medii de cultură convenționale pentru numărarea coloniilor. Înaintea infectării cobailor se stabilește pentru fiecare animal media temperaturii bazale prin măsurători făcute în fiecare din cele 5 zile dinaintea inoculării.



Scanned with OKEN Scanner

Dacă numărul de unități formatoare de colonii (UFC) pe mililitru descris mai sus pentru cultivarea probelor de apă este mai mic decît $10^4$, se concentrează proba. Se centrifughează 100 ml la 2 900 turații timp de 30 minute, se elimină supernatantul, se resuspendă sedimentul în 10 ml apă sterilă. Cînd numărul de UFC/ml pentru o probă este mijlociu ($10^4$—$10^6$), se injectează intraperitoneal 3 ml de probă netratată la fiecare din cei 2 cobai. Dacă numărul de UFC/ml pentru o probă este mare ($10^6$) se diluează aceasta la $10^6$ UFC/ml și se inoculează cîte 3 ml de probă diluată la fiecare cobai (schema 1).

Proba de apă cultura pe agor UFC/ml

| dacă e sub ($< 10^4$) | dacă e moderată ($10^4$—$10^6$) | dacă e mare ($> 10^6$) |
|---|---|---|
| Se centrifughează 100 ml probă 2 900 xg, 30 min. ↓ Se decantează → supernatantul | Se injectează 3 ml/animal | Se diluează cu $H_2O$ distil. steril. la $10^6$ UFC/ml ↓ Se injectează 3 ml/animal |
| Se resuspendă sedimentul în 10 ml $H_2O$ sterilă ↓ Se injectează 3 ml/animal | | |

### OBSERVAREA COBAILOR INOCULAȚI ȘI COLECTAREA SPLINEI

Se măsoară temperatura cobailor inoculați în fiecare zi timp de 7 zile și se observă animalele pentru semnele de boală : blană zbîrlită, lăcrimarea ochilor, prostrație, hipertermie. Dacă temperatura se ridică cu 0,6°, 2 zile consecutiv, sau se observă o creștere a temperaturii însoțită de unul din simptomele mai sus menționate, se sacrifică animalele și se recoltează steril splina din care se face însămînțarea directă pe mediile de izolare I și II. Se poate însămînța, eventual și exsudatul peritoneal, care se prelevează cu un tampon steril.

## 2.4.14. Decelarea prezenței Leptospirelor

Pentru decelarea leptospirelor se recomandă recoltarea probelor de apă de la adîncimea de 0,3—0,5 m. Ele sînt transportate (la rece și ferite de lumina soarelui), prompt la laborator și înainte de a începe lucrul sînt bine amestacte prin agitare puternică.

### ÎNSĂMÎNȚAREA MEDIILOR

Dintre medii lichide și semisolide cu sau fără ser de iepure, în țara noastră este folosit mediul Korthof. Se folosește pentru însămînțare numai mediul perfect limpede și apa filtrată în repetate rînduri, filtrarea fiind fo-



Scanned with OKEN Scanner

losită pentru îndepărtarea altor bacterii potențial patogene, care pot să interfere cu examinarea. Mediul însămînțat este incubat la 28—30°C. Se controlează prezența leptospirelor din 5 în 5 zile, timp de 60 de zile la microscopul cu fond întunecat prin picături puse pe lamă. Dacă sînt observate leptospire se fac subculturi pe medii proaspete urmate de identificarea cu seruri aglutinate imune.

## PROCEDURA DE EXAMINARE PRIN INOCULAREA ANIMALELOR

Infecția experimentală a cobailor se realizează prin inocularea intraperitoneală a 5 cobai tineri (3—4 săptămîni) cu greutate < de 200 g, pentru fiecare probă de apă, utilizînd un inocul de maximum 3 ml apă nefiltrată limpede. Alt lot de cobai se inoculează cu apă filtrată prin membranele filtrante.

Filtrarea este folosită pentru îndepărtarea altor bacterii potențial patogene care pot să interfereze cu examinarea. Diametrul și dimensiunile leptospirelor sînt mai mici decît valorile corespunzătoare pentru Borrelia, Treponema și Spirochaeta, ultimele menționate fiind adesea prezente în apă.

După 4 săptămîni, sîngele cobailor este testat pentru prezența de anticorpi și rinichii sînt examinați pentru prezența leptospirelor patogene.

## TESTAREA ANTICORPILOR

Sîngele recoltat aseptic este testat pentru prezența anticorpilor utilizînd culturi de 4—14 zile de tulpini de leptospiroze (sigur diagnosticate), cultivate în medii lichide. Concentrația antigenului ar trebui să fie în jur de 50 milioane/ml.

Diluțiile de ser 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/1 000 și 1/3 000 sînt efectuate în ser fiziologic.

Proporția antigen-anticorp folosită este dată în următoarea schemă în care este indicat numărul de picături.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ser fiziologic (picături) | 8 | 9 | 9 |
| Ser (picături) | 2 | 1 | 1 |
| Diluția serului | 1 5 | 1 50 | 1 500 |

Amestecul antigen-anticorp pentru testul de aglutinare-liză este preparat după cum se arată în următoarele scheme :

| | | | |
|---|---|---|---|
| Antigen (picături) | 3 | 3 | 3 |
| Diluția serului (picături) | 3(1——5) | 3(1——50) | 3(1——500) |
| Diluția finală a serului | 1——10 | 1——100 | 1——1 000 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Antigen (picături) | 3 | 3 | 3 |
| Ser fiziologic (picături) | 2 | 2 | 2 |
| Diluția serului (picături) | 1(1——5) | 1(1——50) | 1(1——500) |
| Diluția finală a serului | 1——30 | 1——300 | 1——3 000 |

Amestecul antigen-anticorp este incubat pentru 3 ore, în tuburi la 30°C± 0,5°C și pentru 1 oră la temperatura camerei. Ele sînt apoi examinate microscopic. Titrul reprezintă cea mai mare diluție de ser, care după



Scanned with OKEN Scanner

reacția cu antigenul poate provoca aglutinarea a mai mult de 50% din celule. Pentru *screening*, testul trebuie să fie simplificat utilizînd doar 1 pînă la 100-a diluție de ser în testul de aglutinare. Dacă este obținută o reacție pozitivă, pot fi testate alte diluții de ser.

### EXAMINAREA PROBELOR DE RINICHI RECOLTATE ASEPTIC

Țesuturile de rinichi recoltate aseptic sînt mojarate împreună în mediul Korthof. Sînt efectuate apoi suspensii de țesuturi începînd de la $10^{-1}$ pînă la $10^{-5}$.

Pentru fiecare suspensie sînt inoculate 3 picături în tuburi conținînd 7—9 ml mediu lichid Korthof. Tuburile sînt inoculate la întuneric la 30± 0,5°C pentru 2 luni. Culturile sînt examinate în fiecare săptămînă, utilizînd microscopul cu cîmp întunecat.

Dacă este observată creșterea, cultura este inoculată în tuburi cu mediu conținînd 8-azoguanină (100 μg $ml^{-1}$) sau sulfat de cupru (10 μg $ml^{-1}$). Leptospirele saprofite sînt relativ rezistente la acești doi compuși.

Cea mai bună metodă pentru diferențierea leptospirelor patogene de cele nepatogene, este inocularea experimentală pe animale sau în substratul lichid fără ser. Doar tulpinile saprofite cresc în medii fără ser. Leptospirele suspecte, izolate în mediul lichid, pot fi testate față de antiseruri cunoscute prin testul microscopic de aglutinare-liză, după cum se menționează mai sus.

Probele de apă sînt suspectate ca fiind pozitive pentru prezența leptospirelor cînd :

a) cobaii inoculați prezintă un titru de anticorpi serici $\geqslant 100$ sau

b) leptospirele patogene sînt demonstrate în mediile lichide inoculate cu țesuturi de la cobaii inoculați.

Tulpinile izolate de Leptospira sînt trimise la laboratorul de referință de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino“ pentru examinarea serologică suplimentară și confirmare.

## 2.4.15. Metode de investigare virusologică a apei

Necesitatea evaluării riscului reprezentat de poluarea virală a apei pentru sănătatea publică a impus elaborarea și perfecționarea continuă a metodelor pentru detectarea virusurilor din toate categoriile de apă. Dar cu toate că în decursul anilor au fost experimentate și recomandate un număr impresionant de metode de concentrare și izolare a virusurilor din apă, introducerea în practica curentă de supraveghere igienico-sanitară a apei, a unei metode standardizate întîmplină încă dificultăți, datorită : a) concentrațiilor mici de virusuri ce pot fi găsite în mod natural în apă ; b) variabilității numărului și tipurilor de virusuri ; și c) prezenței concomitente în apă a unor impurități dizolvate și în suspensie, care pot interfera cu metodele de concentrare și cuantificare a virusurilor.



Scanned with OKEN Scanner

Metodele utilizate pentru investigarea virusologică a apei cuprind următoarele etape :

a) Recoltarea probelor ;
b) Concentrarea virusurilor din probe ;
a) Recoltarea probelor ;
c) Izolarea, identificare și determinarea cantitativă a virusurilor din concentratele obținute.

### 2.4.15.1. Recoltarea probelor de apă pentru analiza virusologică

Pentru recoltarea probelor se pot utiliza următoarele procedee :

*Recoltarea directă a apei* în flacoane de sticlă sau material plastic, în volum de 0,200—20 l sau și mai mult, în funcție de conținutul viral al apei și de metoda utilizată în continuare pentru concentrarea virusurilor. Uneori, recoltarea poate fi secvențială, prelevînd la intervale regulate de timp probe în volume egale sau proporționale cu debitul apei, care prin amestecare dau o probă compusă, reprezentativă pentru perioada și locul investigat. Procedeul se poate aplica pe fluxul stațiilor de epurare sau al uzinelor de apă, unde pot apărea oscilații ale conținutului viral al apei în cursul unei zile.

În ultimii ani s-au recomandat și experimentat cîteva modele de aparate complexe cu ajutorul cărora se pot recolta și prelucra volume mari de peste 1 000 l apă, direct din sursa investigată, apa recoltată fiind trecută succesiv prin sistemele de concentrare, iar concentratul viral ce se obține în final este de volum redus și poate fi inoculat.

Procedeele directe de recoltare au avantajul obținerii de date cantitative, cunoscîndu-se volumul de apă recoltat.

*Recoltarea apei prin filtrare* prin tampoane de tifon. Se utilizează tampoane confecționate din mai multe straturi de tifon după modelul utilizat de Moore în bacteriologia apelor reziduale, care se scufundă în apa de cercetat (apă reziduală sau de suprafață), unde sînt lăsate diferite intervale de timp (24 ore — cîteva zile). În acest fel, virusurile se concentrează prin adsorbție pe fibrele tamponului, de unde pot fi eluate apoi prin alcalinizare la pH 8—8,5. Lichidul extras din tampon este testat pentru virusuri în mod direct, sau după o altă concentrare. Metoda a fost aplicată frecvent în virusologia sanitară datorită rezultatelor superioare care s-au obținut în recuperarea virusurilor, comparativ cu metoda recoltării directe.

Față de metoda precedentă, recoltarea prin tampoane de tifon prezintă dezavantajul că nu permite obținerea de rezultate cantitative, ci numai calitative, deoarece nu se cunoaște volumul de apă care trece prin tampon. Eficiența metodei este relativ redusă, fiind reținute numai o parte din virusurile care trec prin tampon, în primul rînd cele adsorbite pe particulele din apă.

Coin și colaboratorii au adus îmbunătățiri metodei, utilizînd un recoltor fix cu tampon de tifon în interior, adaptat la robinetul rețelei de apă potabilă, cu debitul de apă măsurabil. Cu acest recoltor a reușit să detecteze o particulă virală la 250 l apă. Cu un sistem asemănător de recoltare și prin eluții repetate, Liu și colaboratorii măresc eficiența procedeului.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.15.2. Concentrarea virusurilor din probele de apă

Densitatea virusurilor în apă este de obicei atît de mică, încît pentru a putea fi detectate, virusurile trebuie în prealabil concentrate din volume mari, reprezentative de apă, în volume suficient de mici pentru a putea fi investigate în continuare prin metodele virusologice de izolare și identificare.

Au fost propuse numeroase metode de concentrare a virusurilor din apă. Eficiența acestora variază foarte mult în funcție de tipurile de virus și de calitatea apei, fiind influențată de prezența substanțelor organice, a unor săruri anorganice și a diferitelor particule din apă.

Se consideră că o metodă ideală de concentrare a virusurilor trebuie să răspundă următoarelor cerințe :

— să poată prelucra cantități mari de apă de diferite feluri în cel mai scurt timp ;

— să fie suficient de sensibilă pentru a putea concentra majoritatea virusurilor prezente în apă ;

— să fie ușor de aplicat și economică ;

— să poată detecta agregatele virale și virusurile adsorbante pe particulele solide, existente în suspensie.

La elaborarea metodelor de concentrare a virusurilor din apă s-au avut în vedere proprietățile fizico-chimice ale particulelor virale și cele legate de compoziția lor nucleoproteică : virusurile sînt biocoloizi, hidrofili în suspensie și manifestă proprietăți de suprafață. Virusurile se adsorb cu ușurință pe diferite substraturi (membrane celulozice, fibre textile variate, particule constituite din polielectroliți insolubili, schimbători de ioni, granule de sticlă, suporturi biologice etc.), la anumite valori de pH și în prezența unor cationi. De asemenea, pot precipita în prezența unor săruri anorganice sau substanțe organice. Avînd caracter amfoter, virusurile pot fi încărcate electric pozitiv, sau negativ în funcție de pH-ul mediului, fiind capabile să migreze într-un cîmp electric. Pot sedimenta prin ultracentrifugare și pot fi reținute prin ultrafiltrare.

În cele ce urmează, vor fi trecute în revistă principalele metode utilizate pentru concentrarea virusurilor din apă.

### METODE DE CONCENTRARE BAZATE PE MECANISMUL DE ADSORBȚIE-ELUȚIE

Virusurile pot fi concentrate din probă de apă prin adsorbția lor reversibilă pe diferite materiale : membrane filtrante, schimbători de ioni, pulbere de sticlă, polielectroliți insolubili, precipitate ale unor substanțe anorganice și organice și altele. De pe aceste substraturi, virusurile sînt ulterior eluate, în volume reduse de lichid.

*Adsorbția virusurilor pe filtre microporoase* este în prezent considerată una dintre cele mai eficiente metode de concentrare a virusurilor din apă, permițînd prelucrarea unor volume mari de apă cu concentrații virale foarte reduse.

Metoda a fost descrisă inițial de către Metcal, apoi de Cliver care au observat că virusurile dintr-o suspensie apoasă pot fi reținute pe filtre membranoase din nitrat sau acetat de celuloză cu porii de dimensiuni mai



Scanned with OKEN Scanner

mari decît diametrul virusurilor, precizînd totodată și unele dintre condițiile care favorizează adsorbția virusurilor și desorbția lor de pe membrane. Wallis și Melnick au dezvoltat și perfecționat metoda pe care au aplicat-o pentru concentrarea virusurilor din apa reziduală, reușind să izoleze un număr mare de virusuri.

În ultimii 10 ani metoda adsorbției virusurilor pe filtre microporoase a suferit diferite transformări și îmbunătățiri fiind în prezent prin numeroasele sale variante, procedeul cel mai frecvent utilizat pentru concentrarea virusurilor din toate categoriile de apă.

Metoda constă în trecerea probei de apă, în volum de la 1 litru pînă la 2 000 sau chiar 4 000 l, printr-un filtru sau o serie de filtre microporoase, fabricate din nitrat sau acetat de celuloză fibre de sticlă, fibre de sticlă combinate cu săruri epoxidice, fibre de sticlă-rășini expoxidice — azbest, și alte materiale cu diferite grade de porozitate (0,2—8 μm). Acestea sînt livrate cu diferite denumiri comerciale și se prezintă sub formă de membrane plate sau plisate, tuburi sau cartușe filtrante, montate în suporturi metalice sau din material plastic.

Reținerea virusurilor pe toate aceste materiale care au încărcătura electrică negativă, se face prin mecanisme complexe de adsorbție, determinate de proprietățile de suprafață ale virusului și ale filtrului și de compoziția chimică și pH-ul suspensiei virale. Adsorbția este favorizată de ionii bi- și trivalenți ($Mg^{2+}$ sau $Al^{3+}$) și pH-ul acid al soluției (pH = 3,5) în timp ce eluția virusurilor are loc în mediu alcalin, la pH peste 9 și chiar mai ridicat, pînă la 11,5 și în prezența substanțelor proteice (ser, extract de carne, bulion nutritiv etc.). Acești factori influențează de altfel și alte procese de adsorbție-eluție a virusurilor care au loc în natură (pe particulele din apă, nămol sau sol), precum și procesele de concentrare a virusurilor prin adsorbție pe alte materiale.

Ca eluenți ai virusurilor de pe filtre au fost recomandați tamponul glicină 0,05 M la pH = 11,5 ; extractul de carne 3% la pH 9 sau tamponul glicină în amestec cu extract de carne la pH 9,5 soluțiile de cazeină izoelectrică, lizină, uree, bulion triptoză, toate la pH alcalin.

Mai recent au fost experimentate și aplicate pentru concentrarea virusurilor, filtre microporoase încărcate pozitiv, din celuloză, rășini schimbătoare de ioni și din alte materiale, capabile să adsoarbă virusurile la pH neutru și avînd avantajul că oferă posibilitatea concentrării virusurilor fără a le supune unor oscilații mari de pH, dăunătoare viabilității lor.

Metoda adsorbției virusurilor pe filtre microporoase prezintă inconveniente, datorită colmatării filtrelor în cazul apelor cu turbiditate mare, fapt ce limitează volumul apei care poate fi prelucrat. Prin aplicarea unor procedee de clarificare a apei pentru prevenirea colmatării filtrelor, o parte din virusuri, care se găsesc adsorbite pe particule, pot fi îndepărtate din proba de apă ce urmează a fi cercetată. Un alt neajuns care reduce eficiența metodei pentru unele ape, este prezența subsanțelor organice dizolvate sau în suspensie, care pot interfera cu virusurile în cursul fazei de adsorbție pe filtre.

Pentru a îmbunătăți eficiența metodei pentru investigarea unor volume mari de apă, Wallis și colaboratorii, au construit un aparat portabil,



Scanned with OKEN Scanner

capabil să prelucreze volume de peste 1 000 l apă pe oră. Apa de cercetat, pompată în aparat trece mai întîi prin filtre clarificatoare din fibre textile, apoi prin filtre adsorbante din acetat de celuloză sau fibre de sticlă. Pentru favorizarea adsorbției virusurilor, apa este tratată cu săruri de magneziu. Eluția virusurilor se face trecînd prin filtrele pe care acestea s-au adsorbit, cu tampon glicină la pH = 11,5, care este imediat neutralizat. Din eluentul în volumul de 2 000 ml virusurile sînt reconcentrate pe mebrane din nitrat de celuloză cu diametru mai mic, printr-o nouă adsorbție-eluție obținîndu-se în final un concentrat în volum de 20 ml, care este apoi testat pentru virusuri. În cercetări experimentale cu acest aparat s-au obținut recuperări de aproximativ 80% din cantitatea de virus introdusă în apă la concentrații inițiale mai mici de 1 u.f.p./l apă. Aparatul descris inițial a fost perfecționat, și pe baza prototipului conceput de Wallis și colaboratorii, a fost construit aparatul „Aquella". Au mai fost realizate și alte aparate sau dispozitive pentru concentrarea virusurilor din volume mari de apă, care pe lîngă filtrele microporoase de diferite tipuri dispuse în serie, sînt prevăzute cu instalații și dispozitive pentru condiționarea apei de cercetat prin adaos de acid, săruri bi- și trivalente, soluție de tiosulfat de sodiu.

În cazul prelucrării unor volume mari de apă, este necesar să se realizeze concentrarea virusurilor în doi sau chiar mai mulți timpi. În primul timp, prin procedee de adsorbție-eluție, proba este concentrată în volum de 1—2 l eluent, după care în al doilea timp este reconcentrată printr-o nouă adsorbție-eluție, sau printr-o altă metodă, obținîndu-se în final un volum de 10—20 ml, care este apoi investigat virusologic. Ca metode utilizate pentru a doua treaptă a concentrării, au fost recomandate : floculareа organică, precipitarea cu săruri anorganice, electroosmoza, separarea cu polimeri în fază dublă și altele. Prin aplicarea succesivă a acestor concentrări, proporția de virusuri recuperate din probele de apă crește, ajungîndu-se pînă la eficiențe de 100% în studii experimentale.

## ADSORBȚIA PE PULBERI INSOLUBILE

*Pulberea de sticlă,* experimentată și recomandată de autorii francezi Sarrette și colaboratorii, și Schwartzbord și Lucena-Gutierrez, reprezintă un excelent adsorbant pentru virusuri din probe de apă de volum de 50—400 l. Virusurile sînt adsorbite pe granule de sticlă în prezența $AlCl_3$ în concentrație de 0,005 M, la pH = 3,5 iar eluarea se face cu tampon glicină la pH 11,5. Pentru prelucrarea probelor, autorii au construit un aparat relativ simplu din sticlă pyrex. Eficiența metodei, în cercetări experimentale cu virus poliomielitic, a oscilat între 36 și 100%.

*Polielectrolitul* $PE_{60}$, un polimer insolubil de stirenanhidridă maleică, a fost experimentat și recomandat cu material adsorbant pentru virusurile din apă de către Wallis și colaboratorii, și Grinstein și colaboratorii. Adsorbția virusurilor are loc în mediu ușor acid (pH 5,5—6), iar eluția, în tampon borat pH 9 cu adaos de ser de vițel. Metoda are o eficiență foarte bună, apropiată de 100%, verificată și în studii de teren. Această metodă a fost aplicată și de către Nestor și colaboratorii, în studiul poluării virale a Dunării și a altor ape de suprafață din România, precum și în investigarea unor probe de apă de băut.



Scanned with OKEN Scanner

*Pulberea de talc* a fost testată experimental de către Sattar și Westwood în Canada, fiind recomandată în amestec cu celit (un pămînt de diatomee) pentru concentrarea virusurilor din apa reziduală și din apa de băut.

*Bentonita* a fost testată experimental de către Turck și colaboratorii, în privința capacității de concentrare a virusurilor.

În URSS, Mișliaeva și colaboratorii recomandă diferiți sorbenți naturali din grupa alumino-silicaților (caolinită, bentonită ș.a.), pentru concentrarea virusurilor din apa potabilă, de suprafață și ape reziduale, obținînd în studiile experimentale eficiențe ale recuperării virusurilor între 89 și 96%.

## ADSORBȚIA VIRUSURILOR PE SARURI ANORGANICE PRECIPITABILE

Sulfatul de amoniu, sărurile de aluminiu, clorura ferică, oxizii de fier, sărurile de calciu au fost utilizate în mod experimental și recomandate de diferiți autori, pentru concentrarea virusurilor din apă. Aceste substanțe introduse în apă în anumite condiții pot da naștere la precipitate pe care se pot adsorbi materialele în suspensie, inclusiv virusurile, care se recuperează apoi prin dizolvarea precipitatului în solvenți potriviți de volum mai redus.

În practică, cel mai frecvent se utilizează precipitatul de hidroxid de aluminiu, pregătit în prealabil și introdus în proba de apă, sau format pe loc, după adaosul la proba de apă a unei soluții de clorură sau sulfat de aluminiu. Precipitatul pe care s-au adsorbit virusurile este colectat și resuspendat în ser fiziologic care se inoculează sau este eluat cu o soluție tampon la pH ridicat cu adaos de ser de vițel.

Această metodă este recomandată și de „Metodologia Standard de Analiza Apei" din SUA (ediția 1979), fiind aplicabilă pentru concentrarea virusurilor din volume mici de apă poluată sau ca treapta a doua a concentrării virusurilor după un alt procedeu aplicat în prealabil.

## ADSORBȚIA PE DIFERITE SUBSTRATURI BIOLOGICE

În condiții experimentale, Armon și colaboratorii utilizează pentru adsorbția virusurilor membrane eritrocitare de porc, recuperînd virusurile (bacteriofagi coli și poliovirus cu o eficiență de peste 92%).

În cercetări efectuate în țara noastră, s-a utilizat mult metoda *adsorbției pe celule de levură de bere* Sacharomyces cerevisiae, descrisă de Nestor în 1967. Metoda a avut o eficiență variabilă în studii experimentale, obținîndu-se uneori recuperarea în totalitate a virusurilor utilizate (colifagi și enterovirusuri), și a fost aplicată în practică în apa de toate categoriile, dînd rezultate comparabile cu metoda adsorbției pe polielectrolitul $PE_{60}$.

## SEPARAREA ÎN SISTEME LICHIDE CU FAZĂ DUBLĂ

Prin amestecarea a doi polimeri organici sintetici (polietilen glicol și dextran sulfat de sodiu) în soluție apoasă se formează un sistem cu două faze lichide. Amestecînd proba de apă de cercetat cu cele două sub-



Scanned with OKEN Scanner

stanțe în anumite proporții, virusurile se vor concentra în faza inferioară de dextransulfat, de unde pot fi recuperate.

*Hidroextracția.* Proba de apă de cercetat este introdusă într-un sac de dializă din celuloză, care la rîndul său este imers într-un agent hidrofil (polietilen glicol), care extrage apa prin ultrafiltrare osmotică, în timp ce virusurile rămîn în interiorul sacului de dializă, într-un volum redus de lichid.

*Ultracentrifugarea.* Centrifugarea, la turații de 40 000—60 000 rotații pe minut este o metodă foarte eficientă pentru concentrarea virusurilor, utilizată independent sau în combinație cu alte procedee. Pentru volume mari de lichid se poate utiliza ultracentrifugarea cu flux continuu.

*Ultrafiltrarea* constă în filtrarea sub presiune a unei soluții printr-o membrană cu pori de dimensiunea, care permite trecerea apei și a materialelor cu greutate moleculară mic, dar exclude virusurile și macromoleculele, care astfel se concentrează pe membrană. Datorită colmatării rapide a filtrelor, procedeul se poate aplica pentru volume mici de apă sau pentru reconcentrare după aplicarea unui alt procedeu. În acest scop, se pot utiliza filtre solubile din alginat de sodiu.

*Electroforeza și electroosmoza* se bazează pe capacitatea virusurilor de a migra într-un cîmp electric spre catod, datorită încărcării lor negative la pH neutru.

*Floculărea organică,* descrisă inițial de Katzenelson și colaboratorii, se bazează pe proprietatea soluțiilor proteice de a precipita în mediu acid. Ca substanțe proteice precipitabile, se recomandă extractul de carne 3%, laptele praf ecremat și cazeina inzoelectrică în concentrație de 1%. Virusurile înglobate în precipitat pot fi recuperate după dizolvarea acestuia într-o soluție alcalină. Metoda floculării organice este foarte mult utilizată pentru reconcentrarea virusurilor în a doua sau a treia treaptă, după aplicarea altor procedee de concentrare.

### 2.4.15.3. Izolarea, identificarea și determinarea cantitativă a virusurilor din probele concentrate

Probele obținute după aplicarea oricăruia din procedeele de concentare descrise, vor putea fi testate în privința conținutului viral numai după ce au fost decontaminate bacteriologic, adică după îndepărtarea bacteriilor și a altor microorganisme pe care le conțin. În acest scop, se recomandă tratarea cu amestecuri de antibiotice și antifungice în soluții concentrate, precum și tratarea cu eter sau cloroform. Înainte de inocularea pe sistemele de izolare a virusurilor, probele trebuie păstrate în condiții de temperatură care să reducă la minimum posibilitatea micșorării conținutului viral. La temperatura camerei, probele pot fi menținute cel mult două ore, iar în frigider la temperaturi de 4—10°, pînă la 48 ore. Dacă nu pot fi inoculate în acest interval de timp, probele se vor păstra în congelator la —70°C.

Izolarea virusurilor din probele concentrate se face prin tehnicile de laborator virusologic: inocularea pe culturi celulare și pe animale de la-



Scanned with OKEN Scanner

borator sensibile, urmată de identificarea tulpinilor virale izolate, prin reacții serologice.

Inocularea pe culturi celulare : se pot utiliza culturi celulare primare de rinichi de maimuță sau linii celulare stabilizate de origine umană HeLa, KB, Hep 2 sau simiană : Vero, BGM, BSC. Acestea sînt aplicabile în general pentru detectarea enterovirusurilor, reovirusurilor și adenovirusurilor. Probabilitatea de izolare a virusurilor crește cu numărul de sisteme celulare utilizate, de aceea se recomandă cel puțin două sisteme celulare dintre care unul de origine umană. Prezența virusurilor produce pe culturile celulare leziuni caracteristice (efect citopatogen).

Pentru detectarea rotavirusurilor din probele de apă și apă reziduală se pot utiliza culturi celulare de tip MA-104 (celule de rinichi fetal de maimuță rhesus). Prezența virusurilor în culturile celulare inoculate se decelează prin : reacția de imunofluorescență, testul ELISA sau prin microscopie electronică.

Inocularea la animale : pentru izolarea virusurilor Coxsackie (grupa A și B) se inoculează șoareci nou-născuți la care se produc paralizii de tip flasc sau spastic și leziuni histopatologice caracteristice.

În cazul izolării virusurilor poliomielitice este important să se facă diferențierea între tulpinile sălbatice și cele vaccinale, prin urmărirea unor markeri genetici, cel mai utilizat fiind markerul termic sau rct. 40.

Determinarea cantitativă a virusurilor din probele de apă este necesară pentru precizarea gradului de încărcare virală a unor ape și pentru stabilirea normelor virusologice pentru ape de diferite calități și utilizări.

Cuantificarea virusurilor se poate realiza prin două metode :

— prin inocularea diluțiilor zecimale ale probei virale pe o serie de tulpini cu culturi celulare se poate determina $DICT_{50}$ (doza infectantă pentru 50% din culturile celulare) ; metoda tuburilor permite estimarea numărului probabil de unități virale infectante (în mod asemănător cu determinarea numărului de coliformi) ;

— metoda plajelor : prin cultivarea virusurilor din volume cunoscute de suspensie virală în plăci cu culturi celulare sub un strat de agar, fiecare particulă virală poate iniția apariția unei zone de liză celulară (plajă), fiind considerată unitate formatoare de plaje. Prin numărarea plajelor apărute din inocularea unei probe și a diluțiilor acestora se poate aprecia cantitatea de virusuri din probe.

Numărul mare de procedee de investigare virusologică a apei care s-au descris și experimentat pînă în prezent, arată că deși există preocupări în majoritatea laboratoarelor de profil din lume, pentru elaborarea metodologiei de evidențiere a poluării virale a apei, încă nu s-a ajuns la un consens unanim privind precizarea unor metode optime aplicabile în supravegherea calității virale a apelor. Cîteva dintre variantele propuse au fost adoptate de un număr mare de laboratoare și acceptate de specialiștii OMS, fiind recomandate și în „Metodele Standard pentru analiza apei și apei reziduale" (ediția 15), publicată de către Asociația Americană de Sănătate Publică din Statele Unite ale Americii în 1980. Cercetările în acest domeniu continuă și probabil în curînd se vor elabora metode îmbunătățite care vor putea estima cît mai aproape de realitate calitatea virală a apei.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.16. Determinarea prezenței Candidei în apă

Probele de apă se recoltează din aceleași puncte de recoltă folosite pentru analiza microbiologică și chimică.

Se recoltează eșantioane de apă în sticle sterile cu capacitate de 100 ml.

În cazul în care scopul analizei vizează numai prezența micetelor, se vor alege punctele de recoltă în funcție de scopul urmărit, suficiente pentru a permite caracterizarea sanitară a categoriei de apă care se cercetează.

Cantitatea de apă prelevată fiind mică — 1 ml — se recoltează o cantitate de apă pînă la 100 ml. Transportul probei trebuie asigurat în timpul cel mai scurt, iar păstrarea probei pînă în momentul însămînțării se va face la temperatură de + 4°C. Timpul maxim de păstrare la + 4°C nu va depăși 24 ore.

### TEHNICA ÎNSĂMÎNȚĂRII

Se depune pe suprafața unei plăci cu mediul de cultură Sabouraud cu antibiotic, 1 ml apă și se etalează cu spatulă de sticlă sterilă. Se introduce la termostat la 37°C cu capacul întredeschis, pînă la uscarea suprafeței, după care se închide capacul.

Incubarea se face în poziția plăcii cu capacul în sus, iar timpul de incubare este de 24, 48, 72 h, după fiecare interval în parte notînd apariția coloniilor cu următoarele caractere :

— colonii cremoase alb cenușii de diferite dimensiuni, cu margini neregulate, uneori cu aspect plisat sau colonii cu aspect stelat cu centrul ridicat și prelungiri radiare sau colonii rotunde plate, albe, perlate, de consistență cremoasă.

Din fiecare tip de colonie, suspecte a fi din genul Candida, se practică examen microscopic direct, în preparat proaspăt între lamă și lamelă.

În acest mod se stabilește prezența de celule levurice înmugurite sau mai rar, prezența de pseudomicelii.

Tipurile de colonii confirmate prin examenul microscopic sînt fiecare în parte dispersate în suprafață pe cîte o placă cu mediul Sabouraud fără antibiotic și incubate la 37°C timp de 24 h, după care colonii absolut caracteristice, se repică pe același mediu Sabouraud în tuburi.

Tuburile cu tulpini astfel obținute se pot stoca sau diagnostica imediat prin stabilirea caracterelor morfo-fiziologice și biochimice pentru Candida albicans.

### IDENTIFICAREA CANDIDEI ALBICANS

Pentru diagnosticarea rapidă a Candidei albicans se practică teste specifice ca :

### TESTUL DE FORMARE A CLAMIDOSPORILOR

Din tulpina izolată se însămînțează prin înțepare un tub cu mediul P.C., turnat drept.



Scanned with OKEN Scanner

Înțeparea se practică în 3—4 puncte diferite producînd o dîră în grosimea mediului.

Tuburile astfel însămînțate se păstrează 48 h la temperatura camerei (20—25°C), intervalul în care dîra produsă prin însămînțare devine vizibilă.

De la acest nivel, din profunzimea mediului se ia cu ansa un fragment de mediu care se strivește între lamă și lamelă și se examinează la microscop. În cazul prezenței de clamidospori se observă celule regulate sferice, așezate terminal în raport cu filamentele, uneori izolate dar mai frecvent grupate, cu perete celular gros cu dublu contur, refrigerent.

Punerea în evidență a clamidosporilor constituie un element deosebit de important pentru diagnosticarea Candidei albicans.

Dacă examenul este negativ se repetă după 4—5 zile. Dacă și cea de-a doua citire rămîne fără rezultat, se fac treceri din fiecare tub în alte 3 tuburi cu mediul P.C., drept, prin înțepare și se procedează ca de la început.

## TESTUL DE FILAMENTARE

Pentru efectuarea testului este necesar ser normal de iepure căruia i se stabilește în prealabil factorul de filamentare în prezența unei tulpini test de Candida albicans.

Se repartizează 0,5 ml ser de iepure în eprubete de hemoliză. Cu ansa se ia un fragment de cultură din tulpina test și se emulsionează într-unul din tuburile ce conțin ser de iepure.

Aceeași operație se efectuează și cu tulpina sau tulpinile necunoscute, folosind alte tuburi.

Toate tuburile se incubează 3 ore la 37°C. După acest interval, cu o pipetă Pasteur se ia din fundul eprubetei în care se testează serul, o picătură, care se depune pe o lamă, se acoperă cu lamelă și se examinează la microscop pentru a observa formarea filamentelor.

Dacă serul de iepure nu produce filamentarea pe tulpina standard de Candida albicans, citirea celorlalte tuburi nu se mai face.

Se reia proba folosind alt ser care dă testul pozitiv cu tulpina standard în prezența căruia se testează și tulpinile necunoscute.

Testul de filamentare pozitiv indică prezența speciei Candida albicans. Determinarea caracterelor morfo-fiziologice și bio-chimice se fac în scopul identificării și a celorlalte specii de genul Candida. Pentru aceasta se preiau tulpinile stocate pe mediul Sabouraud înclinat, proaspăt trecute cu 24—48 h înainte de testare.

Se folosește următoarea schemă :

1) Caractere de cultură pe medii lichide :
   a) Mediul Sabouraud lichid ;
   b) Mediul alcool 3%.
2) Caractere de cultură pe medii solide :
   a) Mediul Sabouraud solid ;
   b) Mediul geloză sînge.

3) Caractere biochimice și de metabolism :
a) Fermentarea zaharurilor — zimogramă ;
b) Asimilarea zaharurilor — auxonogramă pentru sursă de carbon ;
— auxonogramă pentru sursă de azot.

1) Caractere de cultură pe medii lichide :

a) Sabouraud lichid.

Pentru a observa caracterele pe medii lichide se repică, pe mediul Sabouraud lichid, notînd la 24 h după incubare la 37°C formarea de văi, inel, depozit.

Diagnosticarea de specie se face în corelație cu celelalte teste conform tabelului nr. XXVI de la pagina 167.

b) Mediul alcool 3%.

Se însămînțează din cultură, pe mediul alcool etilic 3% și se păstrează la 37°C timp de 7 zile, după care se notează prezența sau absența creșterii.

2) Caractere de cultură pe medii solide.

Mediul geloză sînge și Sabouraud solid.

Se însămînțează din cultură pe mediul geloză sînge și se păstrează la 37°C timp de 24—48—72 h, după care se notează caracterul de cultură al coloniilor.

3) Caractere de cultură și metabolism.

a) Fermentarea zaharurilor — zimogramă.

Se fac însămînțări — un vîrf de ansă — din cultura tînără de 24—48 h, în apă peptonată 1% cu zahărul testat. Obligatoriu se lucrează pe 6 zaharuri : glucoză, rafinoză, maltoză, lactoză, zaharoză, galactoză.

Se astupă eprubetele astfel pregătite cu dop de parafină plasat chiar deasupra mediului și se incubează la 23—37°C.

Se citesc la 3—4 zile. Dopul împins înseamnă fermentarea zaharurilor. Se citesc și la 3 săptămîni. Tulpinile care nu fermentează după 3 săptămîni sînt levuri azimatice.

b) Asimilarea zaharurilor — auxonogramă pentru sursa de carbon.

Se însămînțează 1 ml suspensie de cultură de candide prin încorporare, în momentul repartizării mediului Lödder I în plăci sterile. Se elimină apa de condensare.

La suprafața mediului într-o ordine determinată se pune cîte o picătură din zaharurile testate (soluție de zaharuri de 10% : glucoză, galactoză, lactoză, maltoză, rafinoză, zaharoază).

După 10—12 ore se citește creșterea levurilor pe zona corespunzătoare difuzării (difuziunii) zaharului asimilat.

c) Auxonogramă pentru sursele de azot.

Tehnica este aceeași ca pentru sursa de carbon.

Se înlocuiește mediul Lödder I cu mediul Lödder II. În loc de zaharuri se folosesc următoarele substanțe : sulfat de amoniu, nitrat de potasiu, uree, aglicocol, asparagină.

Rezultatele testelor descrise mai sus, sînt interpretate după tabelul nr. XXVI prezentat la pag. 167.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.17. Determinarea prezenței helminților din apă
## Recoltarea probelor

Probele de apă se vor recolta din aceleași puncte de unde se recoltează probe pentru analiza microbiologică, chimică, biologică.

Cantitatea de apă necesară analizei parazitologice variază în funcție de sursa de apă și calitatea ei.

Pentru punerea în evidență a ouălor de geohelminți din apa potabilă și din instalațiile de tratare a apei, se recoltează 10 l apă în damigene de sticlă.

Pentru apa de suprafață și ape din stațiile de epurare se recoltează 100 l apă care se filtrează, la locul recoltei, prin pernițe Moore.

### TEHNICA DE PRELUCRARE A PROBELOR DE APĂ POTABILĂ ȘI DIN INSTALAȚIILE DE TRATARE A APEI

Se pune la sedimentat 10 l apă, în bacuri de sticlă, timp de 24 ore. După 24 ore lichidul supernatant se îndepărtează prin sifonare, cu multă grijă, pentru a nu antrena sedimentul depus. Se analizează sedimentul obținut prin sedimentarea celor 10 l apă. Sedimentul se centrifughează cu ser fiziologic și se examinează la microscop în întregime, între lamă și lamelă.

Dacă sedimentul este cantitativ mult, se procedează astfel :

a) separarea ouălor de particulele de care aderă :

Sedimentul se amestecă cu o cantitate dublă de hidrat de sodiu sau potasiu soluție 5%. După o perioadă de contact de 1 h se agită timp de 10 minute la agitator electric. Se centrifughează la 200—300 turații/minut, timp de 1—2 minute, îndepărtîndu-se apoi lichidul supernatant, prin decantare.

b) extragerea ouălor prin flotare :

Sedimentul obținut prin centrifugarea amestecului sediment-hidrat de sodiu se amestecă cu o soluție saturată de nitrat de sodiu sau potasiu cu $D = 1{,}19$ care are rol de a antrena ouăle la suprafața amestecului.

Se centrifughează de 5—6 ori, timp de 1—2 minute, de fiecare dată recoltînd peliculele din stratul superficial cu o ansă în formă de L, de fiecare dată amestecînd conținutul cuvelor cu o baghetă de sticlă.

Peliculele recoltate se adună într-o cuvă de centrifugă de 10 $cm^3$ care conține 1 $cm^3$ ser fiziologic sau apă distilată.

Se centrifughează 15 minute.

Se sifonează supernatantul, iar sedimentul se citește în întregime la microscop. Rezultatul se exprimă la litru ($dm^3$).

### PENTRU APA DE SUPRAFAȚĂ ȘI APA DIN STAȚIILE DE EPURARE

Pernițele Moore prin care s-au filtrat 100 l apă se pun în bacuri de sticlă, se spală cu 500—1 000 ml apă distilată, în bacuri de sticlă. Se lasă la sedimentat 24 h.

Se analizează sedimentul în întregime după modul de lucru descris pentru apa potabilă.

Rezultatele se exprimă la litru ($dm^3$).

*Criterii :* Apa potabilă nu trebuie să conțină ouă de geohelminți.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.4.18. Analiza biologică a apei

### 2.4.18.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor de biologie

Alegerea punctelor de recoltă se face în funcție de scopul urmărit. Este bine ca punctele de recoltă să fie aceleași pentru analizele biologice, bacteriologice și fizico-chimice, în vederea unei corelări corespunzătoare a rezultatelor.

Proba *planctonică* se realizează prin filtrarea a 100 l apă prin fileu planctonic nr. 25 (fig. 7).

Probele *bentonice* :

— pentru faciesul litofil — recoltarea se face pe fundul pietros al apei, cu draga cu buzunar tip Mălăcea (fig. 8) ;

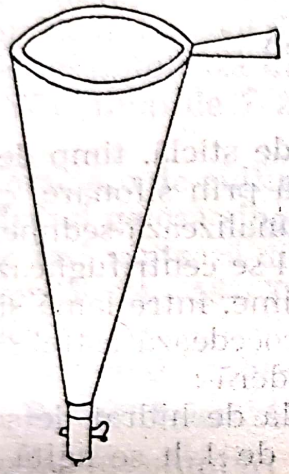


*Fig. 7* — Fileu planctonic

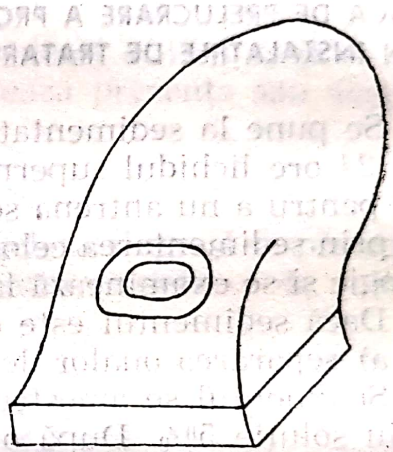


*Fig. 8* — Dragă cu buzunar

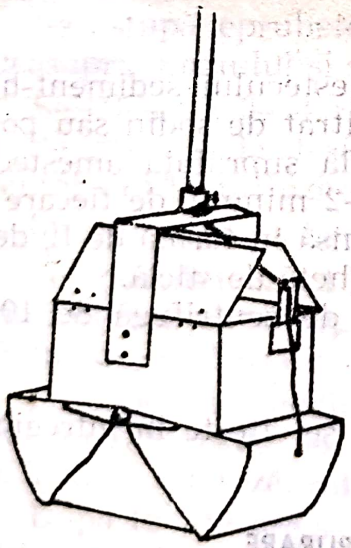


*Fig. 9* — Dragă de fund

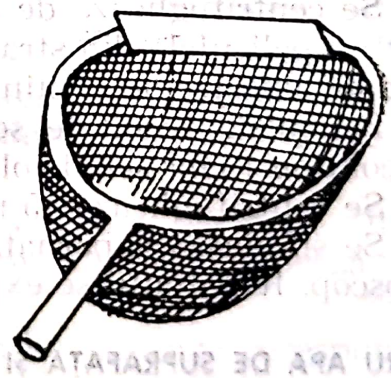


*Fig. 10* — Ciorpac limnologic

— pentru faciesul mîlos — recoltarea se face cu draga de fund sau apucătoare (fig. 9) ;

— pentru faciesul filofil — recoltarea se face în zona litorală cu plante acvatice, cu ajutorul ciorpacului limnologic. Ciorpacul limnologic servește și la colectarea planctonului din iazuri (fig. 10).



Scanned with OKEN Scanner

*Microbentosul* se recoltează cu ajutorul unei raclete prevăzute cu o tijă ; fragmentele de tulpini și pietricele se culeg cu mîna.

Microbentosul de pe substrat se recoltează cu un tub de sticlă (diametru 6 mm) îndoit, prevăzut cu o pară de cauciuc, care are rolul de a aspira organismele mici. Proba cantitativă (de circa 3 ml biodermă) recoltată de pe suprafața determinată se îmbuteliază în sticluțe sau eprubete prevăzute cu dop, peste care se toarnă apă, în cantitate triplă. Este necesar să se menționeze procentul de suprafață acoperită din suprafața investigată.

Probele se recoltează în recipiente de sticlă curate, nesterile.

**CONSERVAREA PROBELOR**

Se face în cazul în care proba nu poate fi transportată și analizată în timp scurt, pentru a evita modificările caracteristicilor biologice ale apei (de la 4 ore la 10—12 ore).

Conservarea probelor se face prin adăugare de 10—12 $cm^3$ soluție 4% formaldehidă la 1 $dm^3$ probă. Pentru menținerea integrității structurale a animalelor microscopice necesare determinării (exemplu : protozoarele), proba se conservă prin adăugarea a 4 $cm^3$ amestec 2 la 1 glicerină și alcool etilic 96% volum la 100 $cm^3$ probă.

**TRANSPORTUL PROBELOR**

Probele se vor transporta în condiții care să asigure menținerea temperaturii între 6 și 10°C.

## 2.4.18.2. Apa de suprafață

Probele planctonice se pot analiza direct la microscop în cazul cînd într-o cameră de numărat se întîlnesc circa 10 organisme/litru cîmp microscopic. În cazul unui conținut abundent în organisme sau în cazul înfloririi apelor, se procedează la diluarea probei ținînd cont de volumul apei de diluție la calculul rezultatelor. În cazul unui conținut sărac în organisme se procedează la concentrarea probelor. Concentrarea probelor se face prin sedimentare, centrifugare, filtre de mebrană.

*Sedimentarea.* Proba se agită manual pentru răspîndirea uniformă a sestonului și se pune la sedimentat în eprubete gradate, timp de 24—48 ore, după care se citește volumul sestonului din fiecare eprubetă. Se face totalul sestonului de probă sedimentată, rezultatele exprimîndu-se în ml seston/l apă.

*Centrifugarea.* După omogenizarea probei prin agitare, se repartizează în eprubete de centrifugă ; după echilibrare se centrifughează 5—15 minute la 1 000—3 000 t/min (în funcție de densitate). După centrifugare, supernatantul se sifonează cu grijă pentru a nu antrena sestonul. Se notează atît volumul de apă total al probei centrifugate, cît și volumul sestonului.

Se recomandă a se verifica microscopic eșantionul din supernatant pentru a nu exclude eventualele organisme planctonice de greutate specifică mai mică decît a apei.



Scanned with OKEN Scanner

*Filtrarea prin filtre de membrană.* Se aplică în cazul probelor care conțin organisme planctonice foarte mărunte, puține, și care au greutatea specifică mai mică decît cea a apei.

Se folosesc membrane filtrante cu dimensiunea porilor între 3—5 μm. Înainte de întrebuințare se recomandă fierberea membranelor în apă distilată, de cîte 3 ori, interval de 5—7 minute, după fiecare fierbere schimbîndu-se apa, pentru îndepărtarea substanțelor de impregnare. Timpul maxim de păstrare este de 3—4 zile, în apa în care au fost fierte. Filtrele de membrană astfel pregătite, se atașează în filturl Zeitz cu capacitate de 20—2 000 ml pe placa poroasă și rondela de filtru cantitativă. Filtrul Zeitz se montează la trompa de vid (vas Kitassato). În circuitul dintre vasul Kitassato și trompa de vid montată la robinet, se racordează un manometru pentru a se putea controla presiurea aerului.

Volumul de apă ce urmează a se filtra se stabilește în funcție de densitatea sestonului și stratul de organisme reținut, pentru a nu îngreuna procesul filtrării sau colmatarea filtrului. Filtrarea trebuie să dureze cîteva minute pentru a nu deteriora organismele, ceea ce ar împieta la identificarea formelor. După filtrare, membrana se ia cu ajutorul unei pense și se spală în 10 ml apă distilată într-un vas.

## NUMĂRAREA ORGANISMELOR

*Fitoplancton*

Din proba concentrată se pune o picătură într-o celulă de numărat de tip Bürker Türk care prezintă o rețea de pătrățele cu suprafață de 9 $mm^2$, înălțime 0,1 mm. Se recomandă a se înregistra organismele de pe toată lama (adică din cele 400 pătrățele, pentru a obține o eroare minimă de 10%). Citirea la microscop se face fie în „bandă" fie „linear".

Calcularea rezultatelor se face după formula:

$$X = \frac{1\,000}{\frac{N}{n}} \times a$$

în care:

X = număr de organisme la 1 ml probă inițială
a = numărul de organisme obținut la numărarea pe lamă
N = nr. de ml probă inițială
n = nr. de ml probă după concentrare

*Zooplancton*

Zooplanctonul se obține prin filtrare prin fileu planctonic și se poate citi în diferite celule de numărat (Kolkwitz), cu volum de 1 $mm^2$ determinînd un volum de la 1 la 20 ml. Suprafața lamei, respectiv fundul camerei de numărat, sau lamele de sticlă care acoperă camera de numărat are grosimea de 0,5 mm, este divizată prin gravarea în pătrățele de 1 $mm^2$.

Cu ajutorul unei pipete gradate se umple camera de numărat cu proba ce urmează a fi analizată, se acoperă cu lamelă și se citesc la microscop toate organismele cuprinse în masa apei, în peliculă superficială și pe fundul celulei.



Scanned with OKEN Scanner

Numărul de organisme identificat în volumul de apă analizat, se raportează la cantitatea inițială de apă luată în lucru, conform formulei :

$$X = \frac{a \cdot n}{N}$$

în care :

X = nr. organisme identificate în 1 litru probă inițială
a = nr. organisme identificate în camera de numărat
n = nr. de ml probă obținută prin concentrarea prin fileu planctonic
N = nr. litri trecuți prin fileu planctonic

*Triptonul*

Triptonul furnizează informații, atît asupra naturii substanțelor poluante, cît și asupra proveniență lor.

Abiosestonul cuprinde detritus organic (resturi de plante și animale) și particule anorganice provenite din activitatea geologică (erodarea malurilor, ape de șiroire) etc. Natura lor se stabilește în funcție de dimensiunea particulelor : 0,1—1 μm = natură argiloasă ; 1—5 μm = natură mîloasă ; 5—50 μm = natură prăfoasă, peste 50 μm = nisip de granulație fină.

În tripton se mai includ și reziduurile industriale de dimensiuni reduse, cum ar fi fibrele de celuloză, fibre textile, fibră de păr, fibre de carne nedigerată, granule de amidon, particule de praf, cărbune, picături de ulei, granule de polen etc.

Exprimarea rezultatelor se face în procente în funcție de suprafața ocupată, menționînd puterea de mărire la care s-a făcut citirea.

*Bentos*

Organismele bentonice triate se numără în totalitate. Numărarea organismelor se face pe grupe sistematice — ordine — clase — concomitent cu trierea, ținînd cont de suprafața substratului de pe care a fost prelevată proba. Numărul total de organisme zooplanctonice se raportează la 1 $m^2$.

Determinarea speciilor se face după liste taxonomice, precizîndu-se frecvența fiecărei specii.

Valorile frecvenței absolute a speciei (număr exemplare/$m^2$) se poate transforma în valori relative.

Se utilizează scara de frecvență continuă introdusă de Knöpp (tabel nr. XV).

*Tabel nr. XV*

| *Frecvența generală* | *Frecvența absolută nr. org/m²* | *Frecvența relativă* |
|---|---|---|
| Exemplare izolate | 1—10 | 1 |
| Foarte rare | 10—15 | 2 |
| Rare | 15—20 | 3 |
| Destul de frecvente | 20—50 | 4 |
| Frecvente | 50—100 | 5 |
| Foarte frecvente | 100—500 | 6 |
| Dezvoltare în masă | peste 500 | 7 |



Scanned with OKEN Scanner

Pentru oligochete tubificide care constituie indicatori ai calității apei și care au tendința de a produce înmulțirea în masă, valoarea coeficientului de frecvență relativă trebuie să fie inferior cu o treaptă sau două față de cea corespunzătoare aceluiași număr de exemplare din alte grupe sistematice.

*Microbentosul*

Nu este o analiză uzuală din cauza tehnicii de lucru dificile. Cu toate acestea este necesară pentru completarea informațiilor furnizate de analiza macrobentosului, mai ales cînd acesta este sărac.

Proba se lucrează după o prealabilă agitare pentru omogenizare. Cu ajutorul unei pipete se pune între lamă și lamelă o picătură, care se analizează la microscop.

Pentru analiza cantitativă se efectuează numărarea organismelor din minimum trei preparate a cîte 100 cîmpuri microscopice (deci 2 $mm^2$ fiecare), eventual 50.

Pentru probele răzuite de pe suporturi imersate și de pe substratul solid, numărul exemplarelor găsite din fiecare specie se prelucrează utilizînd scara de frecvență discontinuă (tabel nr. XVI și XVII).

*Tabel nr. XVI*

**Recalcularea frecvenței organismelor de pe substratul solid și obiecte submerse după scara de frecvență 1—9, pe categorii, în funcție de dimensiunile lor**

| *Număr de organisme în 100 cîmpuri microscopice* | *Număr de organisme în cîmpurile microscopice* | *Frecvența h* |
|---|---|---|
| *Categoria de mărime I* — | organisme cu dimensiuni pînă la 50 μm | |
| 1—50 | maximum 1 în fiecare cîmp | 1 |
| 50—200 | maximum 2 într-un cîmp | 2 |
| 200—1 000 | maximum 10 într-un cîmp | 3 |
| 1 000—5 000 | maximum 50 într-un cîmp | 5 |
| 5 000—25 000 | maximum 250 într-un cîmp | 7 |
| nu mai mult de 25 000 | peste 250 într-un cîmp | 9 |
| *Categoria de mărime II* — | organisme cu dimensiuni de la 50—200 μm | |
| 1—5 | maximum 1 în 20 cîmpuri | 1 |
| 6—20 | maximum 1 în 5 cîmpuri | 2 |
| 21—100 | maximum 1 într-un cîmp | 3 |
| 100—500 | maximum 5 într-un cîmp | 5 |
| 600—2 500 | maximum 25 într-un cîmp | 7 |
| mai mult de 2 500 | peste 25 într-un cîmp | 9 |
| *Categoria de mărime III* — | organisme cu dimensiuni 200—1 500 μm | |
| 1 | 1 în 100 cîmpuri | 1 |
| 2 | 1 în 50 cîmpuri | 2 |
| 3—10 | maximum 1 în 10 cîmpuri | 3 |
| 10—50 | maximum 1 în 2 cîmpuri | 5 |
| 50—200 | maximum 2 într-un cîmp | 7 |
| mai mult de 200 | peste 2 într-un cîmp | 9 |



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XVII*

**Recalcularea frecvenței organismelor de la suprafața depunerilor după scara de frecvență 1—9, pe categorii, în funcție de dimensiunile lor**

| *Număr de organisme în 100 cîmpuri microscopice* | *Număr de organisme în cîmpurile microscopice* | *Frecvența h* |
|---|---|---|
| *Categoria de mărime I* | — organisme cu dimensiuni pînă la 50 μm | |
| 60—200 | maximum 2 într-un cîmp | 2 |
| 200—1 000 | maximum 10 într-un cîmp | 3 |
| 1 000—3 000 | maximum 30 într-un cîmp | 5 |
| 3 000—60 000 | maximum 60 într-un cîmp | 7 |
| mai mult de 6 000 | peste 60 într-un cîmp | 9 |
| *Categoria de mărime II* | — organisme cu dimensiuni de la 50—200 μm | |
| 1—5 | maximum 1 la fiecare al 20 cîmp | 1 |
| 5—20 | maximum 1 în al 5-lea cîmp | 2 |
| 20—100 | maximum 1 într-un cîmp | 3 |
| 100—300 | maximum 3 într-un cîmp | 5 |
| 300—600 | maximum 6 într-un cîmp | 7 |
| mai mult de 600 | peste 6 într-un cîmp | 9 |
| *Categoria de mărime III* | — organisme cu dimensiuni de la 200—1 500 μm | |
| 1 | 1 la 100 cîmpuri | 1 |
| 2 | 1 la 50 cîmpuri | 2 |
| 3—10 | maximum 1 în 10 cîmpuri | 3 |
| 10—25 | maximum 1 în 4 cîmpuri | 5 |
| 25—50 | maximum 1 în 2 cîmpuri | 7 |
| mai mult de 50 | aproximativ 1 într-un cîmp | 9 |

Ținînd cont de procentul de dezvoltare al microfitobentosului se calculează densitatea organismelor după formula :

$$d = \frac{f \cdot a}{100}$$

în care :

d = densitatea

f = densitatea stabilită (nr. exemplare numărate în 100 cîmpuri microscopice

a = gradul de acoperire a microfitobentosului exprimat în %.

*Macroflora*

Poate da indicații despre calitatea unui bazin de apă, în special cu caracter stagnant, în vederea aprecierii calității apei și a posibilităților de folosință.

**TEHNICA DE LUCRU**

Studiul microflorei unui biotip cuprinde suprafața ocupată prin gradul de acoperire, densitate și componența calitativă. Acestea se realizează prin determinarea speciilor care se exprimă în procente față de suprafața totală a fundului biotipului dat.

Densitatea macrofitelor se determină în cadre de lemn, care delimitează 0,1—1,0 $m^2$ de unde se extrag plantele și se numără, rezultatele exprimîndu-se în număr plante/$m^2$.



Scanned with OKEN Scanner

Urmărirea biocenozei se face și prin stabilirea greutății masei verzi exprimate în kg/m$^2$ și a masei uscate sau calcinate exprimate în mg/m$^2$.

În acest caz, plantele colectate sînt spălate pentru a îndepărta corpurile străine, se usucă pe hîrtie de filtru, apoi se cîntăresc tot pe hîrtie de filtru, a cărei greutate este cunoscută. Greutatea masei umede se obține prin diferența între cele două cîntăriri.

Greutatea masei uscate sau calcinate se determină după metoda de determinare a reziduului fix.

### 2.4.18.3. **Apa potabilă**

Alegerea punctelor de recoltă, cît și tehnica recoltării, prelucrării, conservării și transportul probelor se face conform metodologiei descrise la punctul respectiv.

Analiza biologică cuprinde determinarea volumului sestonului, identificarea triptonului, determinarea cantitativă și calitativă a organismelor.

Deoarece în apa potabilă frecvența organismelor biologice este relativ mică, probele se concentrează prin diferite metode :

a) Filtrarea :

— Metoda fileului planctonic — este cel mai des folosită. La 10 minute după deschiderea robinetului se filtrează 100 l apă de rețea prin fileul planctonic nr. 25 cu dimensiunea ochiurilor de 40—45 μ. În timpul filtrării, fileul planctonic trebuie să stea cufundat într-un vas cu apă pentru a crea o presiune mică în fileu, ceea ce permite o reținere mai bună a elementelor fine, iar organismele nu se vor strivi din cauza presiunii mari.

— Metoda filtrării prin filtru de membrană. Se montează membrana fiartă la un filtru Zeitz, a cărei rețea metalică este acoperită cu hîrtie de filtru calitativă. Filtrul Zeitz se montează la balon Kitassato. Se filtrează 0,5—1 l apă, la un vacuum de 120 mm Hg. După filtrare, membrana se ia cu ajutorul unei pense efilate și se spală cantitativ în apă distilată într-un pahar Berzelius în funcție de volumul sestonului obținut.

— Filtrare prin filtru de nisip. Filtrul de nisip este format dintr-o pîlnie cilindrică de sticlă prevăzut la partea inferioară cu un dop de cauciuc perforat, prin care trece un tub de sticlă cu diametru de 10 mm. Tubul de sticlă este acoperit cu o sită care are dimensiunea ochiurilor de cca 100 μ peste care se așază un strat de 13 mm grosime de nisip uscat în prealabil la etuvă la temperatura de 110°C. Filtrarea se execută după metoda filtrării prin filtru membrană. După filtrare se scoate dopul de cauciuc. Nisipul care rămîne în filtru se spală cu 10—15 cm$^3$ apă distilată într-un pahar Berzelius. Se agită bine proba de nisip și se varsă repede supernatantul într-un alt pahar, apoi se repetă operația de spălare cu o cantitate de apă în funcție de sestonul acumulat.

— Metoda centrifugării directe. Se centrifughează 10—100 cm$^3$ apă. Lichidul de deasupra se îndepărtează prin sifonare, lăsîndu-se deasupra sedimentului apa necesară resuspendării sestonului pentru analiza microscopică.

Volumul sestonului se determină prin măsurarea sedimentului obținut printr-una din metodele de concentrare a probelor și se exprimă în cm$^3$/m$^3$ apă.



Scanned with OKEN Scanner

Sestonul obținut se analizează în întregime sau parțial, în raport cu cantitatea de apă folosită la spălare.

Analiza calitativă se poate face în celule Kolkwitz și cristalizoare cu diametrul de 5 cm la stereomicroscop. Se notează speciile identificate și particulele abiotice, precum și importanța sanitară pe care o prezintă : organisme dăunătoare sănătății, indicatori de impurificare, organisme care prin înmulțirea în masă modifică caracterele organoleptice și formează depuneri, organisme care modifică caracterele organoleptice și fizice, organisme care fac patre din biocenoza normală a apei potabile.

### 2.4.18.4. Interpretarea rezultatelor determinărilor biologice

Caracterizarea calității apelor de suprafață prin indicatori biologici se face pe baza sistemului saprobiilor a lui Kolkwitz-Masson revizuit de Liebmann, metodă ecologică directă, ce utilizează speciile de organisme și biocenozele tipice.

Pentru apa potabilă furnizată de instalațiile centrale locale de alimentare cu apă, condițiile de calitate cu referire la proprietățile biologice sînt stabilite de STAS 1342/84.

Sistemul saprobiilor cuprinde bioindicatori specifici pentru apele impurificate cu materii organice și indicatori de sodiu, hidrogen sulfurat, fier, calciu.

Clasificarea apelor după gradul de saprobitate cuprinde 4 zone saprobe :

— clasa I de calitate = zona oligosaprobă — zonă foarte slab impurificată
— clasa II de calitate = zona β mezosaprobă — zonă cu impurificare medie
— clasa III de calitate = zona α mezosaprobă — zonă cu impurificare puternică
— clasa IV de calitate = zona polisaprobă — zonă cu impurificare foarte puternică

Lista organismelor biologice indicatoare, caracteristice fiecărei zone saprobe (după Liebmann — 1962) se găsește în : Biologia apelor impurificate, de I. Mălăcea, Editura Academiei R. S. România, 1969, pp. 84—88.

**CONDIȚII DE CALITATE PENTRU APA POTABILĂ**

Acestea prevăd următoarele :

1. Apa potabilă nu trebuie să conțină organisme animale, vegetale și particule abiotice vizibile cu ochiul liber, nici organisme dăunătoare sănătății, ca ouă sau larve de paraziți sau alte organisme biologice indicatoare de impurificare (care arată un contact direct cu mediul exterior).
2. Organismele care prin înmulțire în masă modifică proprietățile organoleptice sau chimice ale apei și care pot produce degradări ale instalațiilor (ferobacterii), se admit numai în exemplare izolate.



Scanned with OKEN Scanner

3. Volumul sestonului obținut prin filtrare pe fileu planctonic, se admite maximul 1 $cm^3/m^3$ pentru instalațiile centrale și 1 $cm^3/100$ litri pentru instalațiile locale.
4. Numărul organismelor animale microscopice nu trebuie să depășească 20 în $dm^3$ apă.

Pentru caracterizarea igienico-sanitară a apei potabile s-a stabilit lista grupelor de organisme și particule biologice care nu sînt admise sau a căror prezență este limitată în apa potabilă (tabel nr. XVIII).

*Tabel nr. XVIII*

**Grupele de organisme și particulele abiotice care nu sînt admise sau a căror prezență este limitată în apa potabilă**

| *Grupa de organisme și particule abiotice* | *Importanța sanitară* | *Limita admisă în apa potabilă* | |
|---|---|---|---|
| | | *Din sursa subterană* | *Din surse de suprafață* |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| A. *Organisme* | | | |
| I. Vegetale | | | |
| — Bacterii : | | | |
| Sulfobacterii | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| Ferobacterii | înmulțirea în masă modifică caracterele organoleptice și formează depuneri | exemplare izolate | exemplare izolate |
| — Fungii : | | | |
| Ciuperci acvatice | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Alge albastre | înmulțirea în masă modifică caracterele organoleptice | lipsă | exemplare izolate |
| — Alge aurii | modifică caracterele organoleptice | lipsă | lipsă |
| — Diatomee | înmulțirea în masă modifică caracterele fizice și organoleptice | lipsă | pînă la 500 ex./$cm^3$ |
| II. Animale | | | |
| — Protozoare | | | |
| Amoebe | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| Tecamoebe | înmulțirea în masă modifică caracterele fizice și organoleptice | lipsă | exemplare izolate |
| Flagelate | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| Ciliate — poli și alfa saprobe | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Viermi | | | |
| — Rotifere | | | |
| — Saprobionte poli și alfa saprobe | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Beta oligo- și pantosaprobe | fac parte din biocenoza normală a apei potabile | lipsă | în limite admise |
| — Nematode | fac parte din biocenoza normală a apei potabile | lipsă | exemplare izolate |
| — Oligochete | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Ouă de Geohelminți | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |



Scanned with OKEN Scanner

continuare tabel XVIII

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| — Artropode | | | |
| — Tardigrade | fac parte din biocenoza normală a apei potabile | lipsă | exemplare izolate |
| — Crustacei | modifică caracterele fizice | exemplare izolate | exemplare izolate |
| — Hidracarieni | fac parte din biocenoza normală a apei potabile | de forme freatice exemplare izolate | exemplare izolate |
| — Insecte (larve) | modifică caracterele fizice | lipsă | exemplare izolate |
| B. *Tripton* | | | |
| — Păr de animale | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Resturi fecalomenajere (granule de amidon, fibre musculare, celule epiteliale, fibre celulozice etc.) | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Resturi industriale (fibre, textile, cărbune, picături de ulei, gudron) | indicator de impurificare | lipsă | lipsă |
| — Resturi vegetale (frustule de diatomee, grăunțe de polen etc.) | prezența în masă modifică caracterele fizice | lipsă | lipsă |
| — Resturi de animale (căsuțe de teamoebe, spiculi de spongieri, resturi de crustacei, rotifere, insecte) | prezența în masă modifică caracterele fizice | în limita volumului de seston | în limita volumului de seston |

## Bibliografie


1. ALTHAUS H., DOTT W., HAVEMEISTER G., MULLER H., SACRÉ C. — Faecal streptococci as indicator organisms of drinking water, Zent. bl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., 1 Abt. Orig. A, 1982, 252, 2, 154—165.
2. ARMON R., KOTT J., NEEMAN I. — Wat-Sci. Tech., 1985, 17, 71—80.
3. BARON R. C., MURPHY F. D., GREENBERG H. B., DAVIS C. E., BREGMAN D. J., GARY G. W., UHGHES J. M., SCHONBERGER L. B. — Am. J. Epidemiol., 1982, 115, 163.
4. BARTLEX T. D., QUAN T. J., COLLINS M. T., MORRISON S. M. — Membrane filter technique for the isolation of Yersinia enterocolitica, Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43, 4, 829—834.
5. BATES J., GODDARD M. R., BUTLER M. — The detection of rotaviruses in products of Wastewater treatment, J. Hyg. Camb., 1984, 93, 639.
6. BERNAGOZZI M., DE LUCA G., ROMANO G. C., SCERRE E., STAMPIS R. — La Pseudomonas aeruginosa in aeque superficiali molto contaminate, Igiena e Sanita Publica, 1986, 3—4, 89—105.
7. BÎLBÎE V., POZSGI N. — Bacteriologie medicală, vol. II, Edit. Medicală, București, 1985.
8. BLACKLOW N. R., CUKOR G. — Am. J. Public. Health, 1982, 72, 1 321.
9. BLASER M. J., CODY H. J. — Methods for isolating Campylobacter jejuni from low-turbidity water, Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51, 2, 312—315.




Scanned with OKEN Scanner

35. HIGHSMITH A. K., ABSHIRE R. L. — Evaluation of a most-probable number technique for the enumeration of Pseudomonas aeruginosa, Appl. Environ. Microbiol., 1975, 30, 596—601.
36. HOOD M.A., NESS G. E. — Survival of Vibrio cholerae and Escherichia coli in estuarine waters and sediments, Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43, 3, 578—584.
37. HSU S. C., MARTIN Z., WENTWORTH B. B. — Isolation of Legionella species from drinking water, Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48, 4, 830—832.
38. HUGUES B., BOURON Y., PLISSIER M., ANDRE M., PAGLIARDINI A., LAURENT D. — T.S.M. l'eau, 1980, 75, 438.
39. HUGUES B., BOURON Y., PLISSIER M., ANDRE M. — Bbl., Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B., 1980, 171, 487.
40. IRVING L. G., SMITH F. A. — Appl. Environ. Microbiol., 1981, 41, 51.
41. JORET J. C., BLOCK J. C., LUCENA-GUTIERREZ F., SCHWARTZBROD L., HUGUES B., PLISSIER M. — Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1980, 10, 245.
42. KAPLAN J. E., FELDMAN R., CAMPBELL D. S., LOOKABAUGH C., GARY W. — Am. J. Public. Health., 1982, 72, 1 329.
43. KARMALI M. A., FLEMING P. C. — Campylobacter enteritis, Can. Med. J., 1979, 120, 1 525.
44. KESWICK B. H., GERBA C. P., ROSE J. B., TORANZOS G. A. — Wat. Sci. Tech., 1985, 17, 1.
45. KESWICK B. H., GERBA C. P., SECORS L., CECH I. — J. Environ. Sci. Health., A., 1982, 17, 903.
46. KUZNETSOV V. G. — Isolation of Yersinia bacteria strains from various water sources in the Primorsk region, Gighiena i Sanitariya, 1983, 2, 72—74.
47. LAZĂR L. — Impurificarea virală a surselor de apă și importanța igienico-sanitară. Teză de doctorat, I.M.F. Cluj-Napoca, 1984.
48. LAZĂR L., NESTOR I., SOVREA D., IONESCU N. — Date experimentale privind noi metode de concentrare a virusurilor din apă, Ses. Șt. I.I.S.P. Cluj-Napoca, 20.V.1982
49. LAWRENCE G. — Necrotizing enteritis and Clostridium perfringens, J. Infect. Dis., 1986, 153, 4, 803—804.
50. MARCOCI SIMONA — Îndrumar — Metode de analiză biologică pentru urmărirea evoluției calității apelor, CSNA—ICPGA, 1978.
51. MARINELLI G., D'INNOCENZO C., FABIANI L., LEONI V. — Application of a simplified method for recovery of Yersinia enterocolitica from surface waters, Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49, 5, 1 348—1 349.
52. Mc FETERS G. A., KIPPIN J. S., LE CHEVALLIER M. W. — Injured coliforms in drinking water, Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51, 1. 1—5.
53. Mc DANIELS A. E., BORDNER R. H., GARTSIDE P. S. — Holding effects on coliform enumeration in drinking water samples, Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 4, 755—762.
54. MELNICK J. L., SAFFERMAN R., RAO V. C., GOYAL S., BERG G., DAHLING D. R., WRIGHT B. A., AKIN E., STETLER R., SORBER C., MOORE B., SOBSEY M. D., MOORE R., LEWIS A. L., WELLINGS F. M. — Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 144.
55. MIȘLIAEVA L. A., VESELINOVA-STOIANOVA T. B., BAGDASARIAN G. A. — Ghig. i Sanit., 1985, 2, 47.
56. MONYA K. S., MAURY A M. S., RAO K. M. — A simple field test for the detection of faecal pollution in drinking water, Bull. O.M.S., 1982, 60, 5, 787—791.
57. NESTOR I., LAZĂR L., SOVREA D., IONESCU N. — Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. B., 1981, 173, 517.
58. PALMER S. R., GULLY P. R., WHITE J. M — Water-borne outbreak of Campylobacter gastroenteritis, Lancet, 1983, 1, 287—290.
59. PETERSON D. A., HURLEY T. R., HOFF J. C., WOLFE L. G. — Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45, 223.
60. PIPES W. O., CHRISTIAN R. R. — Estimating mean coliform densities of water distribution systems, J. Am. Water Works Assoc., 1984, 76, 11, 60—64.



Scanned with OKEN Scanner

88. VOGT R. L., SOURS H. E., BARRETT T., FELDMAN R. A. — Campylobacter enteritis associated with, contamined water. Ann. Intern. Med., 1982, 96, 3, 292—296.
89. VOSS L., BUTTON K. S., LOREK R. C., TUOVINEN O. H. — Legionella contamination of a preoperational treatment plant, J. Am. Water Works. Assoc., 1986, 78, 1.
90. WATSON D. C. — A note on the use of R—V medium (RV 10/RV) for the isolation of Salmonellas from sewage and sewage studies, J. Appl. Microbiol., 1985, 59, 2, 205.
91. WILLIAMS L. E., LA ROCK P. A. — Temporal occurence of Vibrio species and Aeromonas hydrophila in estuarine sediments, Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 6, 1 490—1 495.
92. ZAVATE OLGA, CAJAL N. — Enterovirusuri nepoliomielitice. Implicații în patologie și în poluarea mediului ambiant, p. 121, Edit. Academiei R.S.R., București, 1983.
93. ZARNEA G. — Tratat de microbiologie generală, Edit. Academiei R.S.R., București, vol. II, 1984.
94. * * * — Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I, Williams/Wilkins, Baltimore-Londra, 1984.
95. * * * — Environmental aspects on the control of legionellosis, O.M.S., Copenhaga, 1985.
96. * * * — O.M.S. — Directives de qualité pour l'eau de boisson. Recomandations, vol. I, p. 18—90, 1985.
97. * * * — Standard Methods for the examination of Water and Waste water, ed. a 15-a, Am. Publ. Hlth. Assoc., 1979.
98. * * * — O.M.S. — Directives de qualité pour l'eau de boisson, Vol. 2, Critères d'hygiene et documentation a l'appuie, O.M.S., Geneva, 1986.
99. * * * — Normes internationales pour l'eau de boisson, Examen biologique, ed. a 3-a, p. 29, O.M.S., 1972.
100. * * * — Examination of water for pollution Control Virological Examination, p. 1—273, Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt, O.M.S., 1982.

Scanned with OKEN Scanner

## 3.1. INTRODUCERE. PROPRIETĂȚILE FIZICE ALE SOLULUI

Sub denumirea de sol se înțelege acea parte a scoarței pămîntului în care se petrec procese biologice.

Sub aspect fizic, solul este format din particule solide, de formă și dimensiuni variabile, cunoscute sub denumirea de grunji sau granule, care de fapt reprezintă particula cea mai mică care rezistă la deformarea mecanică.

Spațiile rămase libere între granulele de sol formează porii solului, iar volumul total al porilor constituie porozitate. Porozitatea solului depinde de mărimea granulelor, de așezarea și uniformitatea acestora ; cu cît particulele sînt mai mari cu atît volumul total al porilor este mai mic. De asemenea, așezarea neregulată sau lipsa de uniformitate a grunjilor reduc porozitatea.

Structura mecanică a solului determină o serie de calități sau proprietăți fizice cu rol important sanitaro-igenic. În continuare vom descrie proprietățile fizice ale solului, proprietăți care prezintă importanță sub aspect microbiologic.

### 3.1.1. Permeabilitatea pentru aer

Permeabilitatea pentru aer a solului depinde de mărimea porilor. În acest sens solurile formate din particule mari ca pietrișul și nisipul, sînt foarte permeabile pentru aer, deși porozitatea lor este redusă.

Cu cît solul conține o cantitate mai mare de aer cu atît procesele microbiologice care se petrec în sol sînt mai active și cu atît solul este mai salubru.

Ca urmare a proceselor microbiologice care se petrec în sol, are loc descompunerea substanțelor organice ; cu cît cantitatea de aer din sol este mai mare cu atît puterea de autopurificare a solului este mai mare.

### 3.1.2. Permeabilitatea pentru apă

Apa din sol are un rol important în diversele procese microbiologice care se petrec în sol. Eliminarea aerului și înlocuirea sa cu apă în porii solului are un efect nefavorabil. În absența aerului procesele microbiologice sînt încetinite, iar solul se consideră insalubru.



Scanned with OKEN Scanner

### 3.1.3. Selectivitatea

Selectivitatea este proprietatea solului de a reține în porii săi diferite impurități care îl străbat. Selectivitatea are la bază fenomenul de adsorbție. Se înțelege că impuritățile care sînt reținute în primul rînd sînt cele în suspensie, inclusiv microorganismele. Astfel, dacă se trece printr-un strat de sol o suspensie microbiană, iar apa care străbate solul este însămînțată pe medii de cultură, ea poate fi practic sterilă.

### 3.1.4. Temperatura solului

Temperatura solului exercită influențe deosebite asupra proceselor microbiologice care se petrec în sol ca și în întreținerea diverselor organisme, inclusiv a microorganismelor ca bacteriile, protozoarele, ciupercile, fungii, actinomicetele și altele, cu rol important atît sanogen, în autopurificarea solului, cît și patogen în transmiterea diferitelor maladii infecțioase și parazitare.

## 3.2. FLORA MICROBIANĂ TELURICĂ

Populația microbiană a solului este cunoscută sub denumirea de microflora telurică. Ea se compune în mare din 6 grupe principale de microorganisme și anume: bacterii, actinomicete, ciuperci, alge, protozoare și virusuri. Numărul lor este variabil, în funcție și de tipul de sol — structura mecanică, proprietățile fizice, compoziția chimică — modul de utilizare a solului și tipul microorganismelor. În tabelul nr. XIX se prezintă un exemplu de repartiție numerică a diferitelor tipuri de microorganisme existente într-un sol agricol fertil.

Cele mai numeroase microorganisme se întîlnesc în straturile superioare ale solului, numărul lor reducîndu-se evident cu cît coborîm în profunzime. Această reducere este mai marcată în solurile minerale, de-

*Tabel nr. XIX*

**Principalele microorganisme prezente în sol**
(după A. Burges, 1958)

| *Organisme* | *Număr pe gram de sol* |
|---|---|
| bacterii | |
| numărare directă | 2 500 000 000 |
| numărare pe plăci după diluție | 15 000 000 |
| actinomicete | 700 000 |
| ciuperci | 400 000 |
| alge | 50 000 |
| protozoare | 30 000 |

pinzînd în mare măsură de cantitatea și calitatea substratului organic. În tabelul nr. XX se prezintă reducerea numărului de organisme în funcție de adîncimea la care s-a efectuat determinarea.

*Tabel nr. XX*

**Distribuția microorganismelor în solul mineral**
(după Drapeau și Jancovik, 1977)

| *Profunzimea în cm* | *Organisme ($10^3$/gr sol)* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *bacterii aerobe* | *bacterii anaerobe* | *actinomicete* | *ciuperci* | *alge* |
| 3—8 | 7 800 | 1 950 | 2 080 | 119 | 25 |
| 20—25 | 1 800 | 379 | 245 | 50 | 5 |
| 35—40 | 472 | 98 | 49 | 14 | 0,5 |
| 65—75 | 10 | 1 | 5 | 6 | 0,1 |
| 135—145 | 1 | 0,4 | — | 3 | — |

Se admite în general că densitatea microflorei bacteriene totale exprimată în număr de celule bacteriene pe gramul de sol este cuprinsă între $10^6$ și $10^9$ (Drapeau și Janvocik, 1977). O exprimare mai corectă însă este cea a biomasei, sau masei de celule vii pe unitatea de suprafață și care pentru bacteriile telurice se consideră a fi cuprinsă între 1 000 și 2 000 kg/ha în solurile puțin poluate, între 3 000 și 7 000 kg/ha în cazul solurilor bogate în bacterii. În general, biomasa bacteriană este inferioară biomasei fungice, dar superioară biomasei algelor și protozoarelor.

Microorganismelor telurice le revin un rol deosebit de important în diversele procese biologice și biochimice care au loc la nivelul solului. Sub acest aspect solul poate fi asemuit cu un imens laborator în care au loc diverse și variate procese biologice. Sub aspect sanitar, aceste procese stau la baza capacității de autopurificare a solului. Din acest punct de vedere se cunoaște că poluarea solului, în mod deosebit cu substanțe organice, este supusă unor procese de degradare conduse de microorganismele telurice. La aceste procese de biodegradare participă de fapt toate organismele din sol, dar rolul principal revine bacteriilor.

Poluarea organică a solului se datorește în principal îndepărtării reziduurilor, cu precădere a celor menajere și zootehnice, dar și unor reziduuri industriale cu componență organică importantă, a celor provenite din industria alimentară în principal.

Substanțele organice poluante prezente în sol, pot persista un timp limitat datorită marii capacități a solului de a degrada și transforma aceste substanțe prin intermediul microorganismelor telurice. Prin această descompunere a materiei organice și transformarea sa în substanțe minerale, se realizează un ciclu natural al elementelor chimice, care trec astfel din sol în plante și animale, respectiv om, pentru a reveni sub formă organică în sol și a relua ciclul. În mod deosebit, acest ciclu este caracteristic pentru azot și pentru carbon, dar și alte elemente urmează îndeaproape aceeași cale (sulful, fosforul).



Scanned with OKEN Scanner

Procesele de degradare a substanțelor organice din sol se petrec la nivele foarte intense datorită numărului mare de germeni care acționează. În funcție de cantitatea de substanțe organice, de structură și calitățile fizice ale solului, ca și de unii factori meteorologici, procesele de descompunere a poluanților organici se pot desfășura aerob sau anaerob. În cazul unei poluări foarte intense și a unui sol puțin bogat în aer se produc procese anaerobe, pe cînd într-un sol bine aerat sau la cantități reduse de poluanți au loc procese aerobe. De altfel, cele două tipuri de procese se pot desfășura succesiv, cele anaerobe trecînd în cele aerobe pe măsura reducerii poluării organice, sau se pot petrece concomitent în cazul unei poluării medii. Procesele anaerobe nu conduc descompunerea pînă la compuși finali, aceasta rămînînd la unii produși intermediari, pe cînd cele aerobe produc totdeauna o descompunere completă. La procesele aerobe și anaerobe iau parte un număr mare de germeni din care puțini sînt strict anaerobi sau strict aerobi, marea majoritate a germenilor telurici fiind aerobi și anaerobi facultativ.

Procesele de descompunere a substanțelor organice poluante din sol se petrec în general în straturile superficiale (10—20 cm) unde poluanții sînt reținuți prin puterea selectivă a solului. Această primă fază este urmată de cea a degradării propriu-zise sau faza biochimică (enzimatică).

Diversele substanțe organice, în funcție de constituția lor chimică, urmează cicluri diferențiate. Astfel, hidrocarbonatele sînt descompuse într-o primă fază pînă la glucoză, iar în cea de a doua pînă la $CO_2$ și $H_2O$. În cursul descompunerii apar o serie de compuși intermediari, ca acizii gluconic, oxalic, fumaric, succinic în cazul descompunerii aerobe și acetonă, acid acetic, acid butiric, acid lactic, acid propionic în cazul celei anaerobe.

Lipidele sînt descompuse într-o primă fază în glicerină și acizi grași ; în faza a doua glicerina se descompune în $CO_2$ și $H_2O$, iar acizii grași mult mai rezistenți, se cumulează în sol fie ca atare, fie sub forma unor produși intermediari, degradîndu-se într-un timp lent.

În fine, proteinele sînt descompuse într-o primă fază în polipeptide, sub acțiunea florei proteolitice, iar ulterior sub influența unor ectoenzime (proteinaze, peptidaze) în acizi aminați. Aceștia la rîndul lor, prin procesele de dezaminare și de decarboxilare, ajung la amoniac. Din acest moment procesul de descompunere se consideră terminat și începe cel de mineralizare, care constă în oxidarea amoniacului în nitriți într-o primă fază și a nitriților în nitrați în faza a doua. Procesul este identic și pentrul sulf și fosfor, în sensul descompunerii pînă la hidrogen sulfurat și hidrogen fosforat, iar ulterior se mineralizează pînă la sulfați și fosfați.

În condiții de anaerobioză, pot apărea și procese inverse de reducere, cu formarea de amoniac, hidrogen sulfurat și fosforat, plecîndu-se de la azotați, sulfați și fosfați.

În fine, în cazul azotului, acesta poate fi preluat și înglobat în sol sub formă de azot teluric organic necesar creșterii plantelor ; acest proces natural constituie humificarea cu rol deosebit în agricultură.



Scanned with OKEN Scanner

## 3.3. POLUAREA MICROBIANĂ A SOLULUI

Organizația Mondială a Sănătății consideră că poluarea solului este consecința unor obiceiuri neigienice sau practici necorespunzătoare. În adevăr, poluarea solului se datorește îndepărtării și depozitării neigienice a reziduurilor lichide și solide rezultate din activitatea omului, a dejectelor animalelor și cadavrelor acestora, a deșeurilor industriale organice sau a utilizării necorespunzătoare în practica agricolă a unor substanțe fertilizatoare.

Principalele elemente poluante ale solului sînt microorganismele patogene sau condiționat patogene, inclusiv paraziții intestinali.

Poluarea microbiană este caracterizată prin diseminarea pe sol, odată cu diversele reziduuri, a germenilor patogeni. Supraviețuirea pe sol a acestor germeni este variabilă și depinde atît de specia microbiană cît și de calitățile solului și condițiile meteoclimatice.

În general, solul, așa cum s-a arătat mai sus, este foarte bogat în floră microbiană proprie, care participă activ la procesele biologice și biochimice care se petrec în sol. În mare parte această floră are calitatea antibiotică față de flora microbiană de impurificare, contribuind în acest fel la distrugerea germenilor patogeni. În plus, solul nu oferă condiții favorabile de temperatură și umiditate, mai ales în straturile sale superficiale, unde se cantonează flora supraadăugată, supusă permanent radiațiilor solare ; nici suportul nutritiv necesar florei supraadăugate nu este asigurat datorită proceselor de biodegradare și mineralizare, astfel încît germenii patogeni dispar sau mai exact sînt distruși după un oarecare timp de supraviețuire în sol.

Timpul de viabilitate însă este foarte diferit de la o specie microbiană la alta. Astfel, o serie de germeni care se prezintă exclusiv sub formă vegetativă nu rezistă decît foarte puțin în sol (de la cîteva zile la cîteva săptămîni) ; alte specii de germeni însă, care au forme de rezistență, prin sporulare, pot supraviețui uneori un timp foarte îndelungat (de la cîteva luni la cîțiva ani). În aceste condiții pericolul poluării bacteriene a solului este deosebit de mare.

Din punct de vedere al proveniență și modului de transmitere germenii patogeni din sol pot fi împărțiți în două grupe :

— germeni patogeni excretați de om și transmiși prin intermediul solului, sau contaminare om—sol—om ;

— germeni patogeni eliminați de animale și transmiși prin intermediul solului, sau contaminare animal—sol—om.

### 3.3.1. Contaminarea om-sol-om

Contaminarea om—sol—om este caracteristică mai ales pentru germeni din genurile Salmonella, Shigella, Escherichia, Vibrio, micobacterium, micrococi, strepto-stafilococi ca și pentru enterovirusuri, virusul hepatitei A, poliovirusurilor, adenovirusurilor, reovirusurilor, rotavirusurilor sau a unor germeni condiționat patogeni.



Scanned with OKEN Scanner

Toți germenii din această categorie au rezistență redusă în sol. Astfel, enterobacteriile au viabilitate medie de la 10—30 de zile, iar enterovirusurile de la 5 la 6 săptămîni. În general, viabilitatea este mai mare în solurile umede. În același timp transmiterea bolii prin contactul direct cu solul este foarte rar întîlnită. Se descrie astfel o epidemie de holeră izbucnită în primul război mondial în armatele austro-ungare, ca urmare a săpării unor tranșee într-un sol contaminat cu vibrioni holerici. De asemenea, epidemia de febră tifoidă de la Vulcan din 1942 s-a datorat poluării solului din apropierea localității, cu reziduuri fecaloide și nu a putut fi jugulată decît după îndepărtarea reziduurilor respective. De cele mai multe ori însă germenii caracteristici contaminării om—sol—om recunosc o cale de transmitere indirectă prin intermediul apei sau alimentelor care se contaminează de pe sol. Din această cauză, de multe ori rolul solului în transmiterea acestor boli este neglijat și ca atare și măsurile de protecție a solului, ceea ce permite persistența poluării și întreținerea epidemiei respective. Din aceleași motive, uneori această transmitere favorizează dezvoltarea unor stări endemice.

### 3.3.2. Contaminarea animal-sol-om

Contaminarea animal—sol—om recunoaște un număr mult mai mare de germeni : leptospire, brucele, pasteurele, rickettsii, clostridii, bacilul antracis, bacilul morvei și altele. Deși fără forme de rezistență, leptospirele, brucelele și pasteurelele pot supraviețui în sol de la 4 la 10 săptămîni. Transmiterea se poate face, atît prin contactul direct cu solul, mai ales în cazul muncilor agricole, cît și indirect prin intermediul apei și alimentelor.

Rickettsia burnetti, agentul etiologic al febrei Q, reprezintă o importantă problemă în numeroase țări din lume, cu precădere în cele cu economie zootehnică dezvoltată. Viabilitatea în sol a rickettsiei este suficient de mare (peste 30 de zile), ca urmare a rezistenței sale mari la desecație. Transmiterea se realizează cu precădere prin intermediul prafului.

Problema cea mai importantă însă o reprezintă grupul germenilor cu forme de rezistență în mediul extern ca bacilul antracis, cl. tetanic, Cl. welhi, cl. edematiens, Cl. septicum, Cl. histoliticum și alții. Prezența lor în sol este deosebit de mare ca urmare a trecerii în forme sporulate în condiții nefavorabile de dezvoltare. Se cunosc așa numitele cîmpii blestemate în care animalele contractau antrax datorită contaminării solului cu acești germeni. Transmiterea afecțiunilor respective se face de cele mai multe ori prin contactul direct cu solul. Este necesară însă și existența unei leziuni cutanate deschise anfractuoase și acoperite cu sol care să creeze condiții de anaerobioză propice dezvoltării germenilor și producerii afecțiunilor respective.

### 3.3.3. Contaminarea sol-om

Solul are un rol important însă și în transmiterea unor germeni care se găsesc în mod natural în sol și nu pot fi legați de poluarea acestuia. Este vorba, în principal, de o serie de ciuperci și antinomicete care obișnuit



Scanned with OKEN Scanner

se găsesc la suprafața solului sau pe vegetație. Transmiterea se face cel mai adesea prin inhalarea de spori sau pătrunderea în pielea favorizată de leziune.

Cele mai frecvente micoze sînt coccidioidomicoza produsă de Coccidioides imitis, întîlnită mai ales în soluri aride și semiaride ; geotricoza ; tricomicoza ; histoplasmoza ; criptococoza ; sporotricoza, aspergiloza și altele. Condițiile de viață și dezvoltare a acestor micete, ca și modul de producere a bolii, nu sînt încă pe deplin elucidate, deși ele ridică probleme medicale importante în majoritatea zonelor din lume.

Tot în această categorie se încadrează și bacilul botulinic care, după unii autori se găsește în mod natural în sol. Rezistența sa este asemănătoare cu cea a germenilor anaerobi de care se deosebește însă în ceea ce privește modul de transmitere. Aceasta se realizează prin intermediul alimentelor contaminate și insuficient prelucrate termic și care prin conservare în condiții de anaerobioză permit dezvoltarea germenilor care își eliberează exotoxina neurotropă dînd una din cele mai grave toxiinfecții alimentare.

### 3.3.4. Parazitozele transmise prin sol

Tot în cadrul poluării biologice, o grupă importantă de afecțiuni este reprezentată de parazitoze și în primul rînd de helmintiaze care pot fi încadrate în cea mai mare parte în contaminarea om-sol-om.

Ca și microorganismele patogene și helminții pot fi categorisiți în două grupe și anume :

— *biohelminți* sau acei paraziți intestinali care au neapărat nevoie de o gazdă intermediară pentru a se putea dezvolta și a atinge stadiul infestant. Din această grupă fac parte în mod deosebit teniile, știindu-se că Tenia solium are ca gazdă intermediară porcinele, iar Tenia saginata bovinele. În cazul în care ouăle acestor helminți nu întîlnesc gazda intermediară, sînt distruse, în special sub acțiunea radiațiilor solare și a uscăciunii ; în medie ele rezistă pe sol cîteva luni de zile.

— *geohelminții* sau acei paraziți intestinali care se dezvoltă direct pe sol în condițiile pe care acesta le oferă, atingînd stadiul de infestare a organismului uman. În această categorie se încadrează o serie de helminți foarte răspîndiți și în țara noastră, ca ascaridul (Ascaris lumbricoides) care produce ascaridioza și tricocefalul (Tricocefalus trichiura) sau trichiurus trichina care produce tricocefaloza. Ambele afecțiuni sînt răspîndite mai ales în localitățile unde condițiile de salubritate sînt defectuoase, mai ales în mediul rural. Ascaridioza este mai frecventă la copii, în timp ce tricocefaloza predomină la populația adultă. Se cunosc și unele deosebiri geografice care țin de sol (structură, compoziție) și de climă (temperatură, umiditate).

Rezistența pe sol a acestor paraziți, eliminați din organismul uman sub formă de ouă este foarte mare, putînd depăși un an și chiar mai mult. Pentru a se dezvolta și a ajunge în faza infestantă, ouăle geohelminților arătați mai sus, trebuie să întîlnească condiții favorabile care sînt reprezentate de o temperatură în jur de 16—18°C, umiditate în jur de 60—80%



Scanned with OKEN Scanner

și lipsa radiațiilor solare directe care le usucă și le distrug. Cel mai frecvent aceste condiții se întîlnesc în grădinile de zarzavat, de aceea de cele mai multe ori transmiterea lor se face prin intermediul legumelor sau zarzavaturilor care se consumă crude. Tot atît de bine se pot transmite însă și prin intermediul altor alimente (fructe), ale apei sau alte diverselor obiecte care vin în contact cu solul infestat cu paraziți. Foarte frecvent însă, transmiterea afecțiunilor se realizează prin contactul direct cu solul, mai ales în cazul copiilor mici care se joacă pe jos, în praf sau introduc în gură mîinile murdare cu sol contaminat cu ouăle acestor helminți.

O altă parazitoză din aceeași categorie care se transmite prin sol este și ankilostomiaza dată de ankilostoma duodenale după localizarea sa în organism. Boala se mai numește, la noi și în toate țările temperate, maladia minerilor, deoarece se întîlnește exclusiv în mine. Faptul se datorește condițiilor speciale de climă pe care le cere parazitul pentru a se dezvolta. Eliminarea se face tot sub formă de ouă din intestinul omului bolnav odată cu dejectele. Pentru a se dezvolta are nevoie de temperaturi mult mai ridicate (24—26°C) pe care le întîlnește în mediul exterior numai în țările calde, fapt pentru care este cunoscută ca o boală tropicală, temperaturi care pot fi prezente în minele adînci. La noi în țară, în prezent, ca urmare a măsurilor luate, boala este eradicată.

În fine, o ultimă parazitoză care poate fi transmisă prin sol este strongiloidoza. Parazitul prezent în intestinul omului bolnav produce ouă care eclozează și eliberează larve care sînt eliminate din organism. În mediul exterior, aceste larve denumite rabditoide, continuă să se dezvolte și în condiții favorabile se înmulțesc prin acuplare. Femelele depun noi ouă din care se dezvoltă o nouă generație. În condiții nefavorabile larvele rabditoide se închistează și dau naștere unor forme rezistente, cunoscute sub denumirea de strongiloide, formă sub care pot rezista mai multe săptămîni. În cazul cînd ajung în contact cu organismul uman, ele își reiau ciclul de dezvoltare. Puțin cunoscută la noi, strongiloidoza a fost descrisă mai ales în Transilvania.

Numărul parazitozelor transmise prin sol poate fi mult mai mare. Unele în care solul nu are decît un rol pasiv ca oxiuroza, al cărui agent etiologic Enterobius vermicularis se elimină din organism în faza infestantă ; altele, în care rolul solului este activ prin condițiile pe care le oferă, dar majoritatea acestor parazitoze nu se întîlnesc în țara noastră, ci în țările calde.

## 3.4. POLUAREA CHIMICĂ A SOLULUI

Poluarea chimică a solului poate fi produsă prin reziduuri menajere și zootehnice, dar mai ales prin reziduuri industriale sau/și ca urmare a utilizării unor substanțe chimice în agricultură.

Poluarea industrială poate oferi o componentă organică, dar de cele mai multe ori are un conținut bogat în substanțe chimice potențial toxice. Studii efectuate în acest sens cu sprijinul O.M.S. au dus la concluzia că poluarea industrială reprezintă o puternică sursă de răspîndire pe sol a unor produși chimici toxici. Se consideră că cel puțin 50% din materiile



Scanned with OKEN Scanner

prime utilizate în industrie contribuie la formarea deșeurilor industriale, din care în jur de 15% pot fi considerate ca toxice sau nocive.

Rolul cel mai important însă din acest punct de vedere îl joacă poluarea chimică agricolă, îndeosebi cu fertilizații sau antidăunători. Deși cea mai mare parte a acestor substanțe sînt biodegradabile, ele se pot cumula uneori în cantități mari și pot persista timp îndelungat în solul poluat. Mai mult chiar, ele pot migra, ca de altfel și poluanții chimici industriali, în zone mai profunde ale solului, ajungînd chiar în apele subterane sau la distanțe de locurile unde au fost utilizate sau depuse.

În fine, nu putem neglija nici unele activități zootehnice care pot produce o poluare chimică periculoasă, ca cele prin folosirea de antibiotice sau biostimulatori.

Toate aceste substanțe prezente în sol nu rămîn, de cele mai multe ori, fără efecte directe sau indirecte asupra microorganismelor din sol. Studii experimentale efectuate în acest sens pe soluri în structură artificială, dar și naturală, au condus la diferențierea a cel puțin două tipuri de acțiuni : unele mai puțin evidente sau mai rar întîlnite privind stimularea creșterii unor microorganisme cu precădere telurice existente în solurile poluate chimic. Aproape întotdeauna însă această fază este tranzitorie, fiind urmată de faza de inhibiție a dezvoltării. De cele mai multe ori, inhibiția se constată de la început. Ca urmare a acestui fapt se înțelege de la sine că prin distrugerea acestor microorganisme cu rol important în biodegradare și autopurificarea solului, aceste procese sînt încetinite, sau chiar oprite, cu consecințe nedorite de persistență a poluării solului și ca atare a riscurilor pentru sănătatea omului. De altfel, unul din criteriile de norme a concentrațiilor maxime admise a substanțelor chimice din sol îl reprezintă și procesul de perturbare a autopurificării acestuia.

## 3.5. INDICATORI SANITARI DE POLUARE MICROBIOLOGICĂ

Recunoașterea nivelului de poluare a solului este astăzi mult rămasă în urmă față de cea a aerului sau apei. Indicatorii sanitari folosiți în prezent pentru depistarea gradului de poluare a solului, pot fi împărțiți în indicatori direcți și indicatori indirecți.

### 3.5.1. Indicatorii direcți ai poluării biologice

Indicatorii direcți ai poluării biologice a solului sînt reprezentați de germenii patogeni a căror prezență atestă pericolul nemijlocit de îmbolnăvire. Determinarea lor întîmpină însă mari dificultăți atît sub aspect tehnic, metodele existente în prezent fiind deosebit de laborioase și încă nesigure, cît și datorită faptului că pentru cea mai mare parte a acestor germeni cu viabilitate limitată în sol, prezența lor poate fi intermitentă. Din aceste motive, în mod obișnuit pentru depistarea poluării biologice, ne adresăm indicatorilor indirecți.



Scanned with OKEN Scanner

### 3.5.2. Indicatorii indirecți ai poluării biologice

Indicatorii indirecți ai poluării biologice a solului sînt reprezentați de o serie de germeni a căror prezență și mai ales număr arată gradul de poluare, ca atare, riscul pentru sănătate. Numărul total al germenilor din sol sau mai exact numărul germenilor mezofili (care se dezvoltă la 35—37°C), constituie un indicator global a cărui valoare, în cazul solului, este mult mai redusă decît ca în cazul aerului, apei sau alimentelor. Dacă prezența acestei flore în sol este legată de prezența omului și animalelor cu sînge cald, în schimb numărul lor este influențat în mare măsură și de alți factori. Astfel, solurile cultivate au un număr mult mai mare de germeni mezofili decît solurile necultivate, solurile umede au, de asemenea, un număr superior de germeni mezofili decît cele aride etc.

Un indicator mai bun decît numărul de germeni mezofili este prezența și numărul de germeni coliformi. Germenii coliformi arată poluarea solului cu conținut intestinal și ca atare posibilitatea prezenței germenilor patogeni, mai ales din grupa de contaminare om-sol-om. Și în acest caz ne adresăm atît germenilor coliformi totali, cît și mai ales coliformilor fecali (Escherichia coli).

Tot ca indicatori ai poluării fecale a solului se determină și prezența în sol a enterococilor (streptococilor fecali) a căror determinare are și avantajul diferențierii poluării umane (ciclul om-sol-om) de poluare animală (ciclul animal-sol-om).

Cercetări efectuate comparativ asupra acestor doi indicatori ai poluării solului de Mallmann și Litsky (1951) au arătat că în timp ce concentrația coliformilor din sol în structură artificială (cilindru de fier galvanizat), nu a fost influențată timp de 11 săptămîni de adăugarea de nămol brut sterilizat (tabel nr. XXI) cea a streptococilor fecali a crescut paralel cu cantitatea de nămol adăugată (tabel nr. XXII).

*Tabel nr. XXI*

**Concentrația coliformilor exprimată logaritmic la 100 gr sol uscat**

| *Număr săptămîni* | *Nămol brut sterilizat adăugat* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *0%* | *5%* | *10%* | *20%* |
| 0 | 5,64 | 6,08 | 5,98 | 5,43 |
| 5 | 4,58 | 5,03 | 0,70 | 5,59 |
| 11 | 3,19 | 4,36 | 5,3 | 3,81 |

Această variație a streptococilor fecali în funcție de cantitatea de material organic a condus pe autorii de mai sus să urmărească variațiile ambilor germeni indicatori și în condițiile neadăugării de material organic. În acest caz, streptococii fecali dispar în timp de 11 luni, în schimb coliformii se păstrează și peste acest interval. Ambii indicatori însă persistă în sol o perioadă de timp mai mare decît Salmonella typhi.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XXII*

**Concentrația streptococilor fecali exprimată logaritmic la 100 gr sol uscat**

| Numărul săptămînilor | Nămol brut steril adăugat | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0% | 5% | 10% | 20% |
| 0 | 5,321 | 5,499 | 6,360 | 6,435 |
| 5 | 2,015 | 1,827 | 3,295 | 3,540 |
| 11 | 0 | 0,977 | 1,200 | 0,700 |

În același timp, supraviețuirea coliformilor fecali și a streptococilor fecali a fost diferită în funcție de anotimp (Dousel, Goldreich și Clark — 1967) și anume : vara coliformii fecali supraviețuiesc un timp mai îndelungat decît streptococii fecali, toamna supraviețuirea a fost aceeași, în timp ce iarna streptococii fecali au supraviețuit un timp mai mare decît coliformii, ceea ce nu este lipsit de semnificație pentru utilizarea lor ca indicatori sanitari.

Ca indicatori sanitari ai poluării fecale se mai poate folosi și prezența și numărul germenilor sulfito-reducători (Clostridium welhi) cu mențiunea că uneori prezența acestui germene poate avea și valoare directă, deoarece alături de alți germeni din clasa Clostridium poate produce gangrenă gazoasă.

Pentru grupa de contaminare animal-sol-om se utilizează, de asemenea, un indicator global reprezentat prin prezența și numărul germenilor termofili (care se dezvoltă la temperaturi în jur de 60°C).

Acești germeni apar și se dezvoltă în cazul poluării solului cu reziduuri solide provenite de la animale (gunoi de grajd) care suferă procese de descompunere cu ridicarea temperaturii interioare în jur de 52—56°C, corespunzătoare temperaturii optime a florei termofile. Identificarea poluării solului cu gunoi de grajd ne atrage atenția asupra posibilității contaminării cu germeni patogeni comuni omului și animalelor ca germeni anaerobi (b. antrax, cl. tetani), leptospirele, brucelele, pasteurelele și altele.

O grupă aparte de germeni indicatori sînt și germenii nitrificatori, sau germenii care iau parte la procesele de transformare a substanțelor organice proteice în substanțe minerale. În această grupă intră nitrococii, ca nitrosomonas care acționează pentru oxidarea amoniacului în nitriți și nitrobacili, ca nitrobacter care transformă în continuare nitriții în nitrați. Prezența acestor germeni arată atît existența unei poluări a solului cît și stadiul de descompunere a substanțelor organice biodegradabile.

În fine, paraziții intestinali pot fi de asemenea utilizați ca indicatori de poluare biologică a solului. Ei au ca și Clostridium welhi o valoare dublă, pe de o parte prezența ouălor de geohelminți arată pericolul de infestare datorită solului, iar pe de altă parte indică prezența poluării acestuia cu dejecte. Dar prin determinarea ouălor de geohelminți se poate diagnostica nu numai prezența poluării solului, ci și vechimea acesteia. Plecînd de la cunoștințele noastre asupra relației dintre condițiile oferite și stadiul de dezvoltare a ouălor, putem stabili vechimea poluării. Astfel, vara, cînd se întrunesc condițiile de dezvoltare dacă constatăm prezența în sol



Scanned with OKEN Scanner

a ouălor de geohelminți nedezvoltate, putem conchide că avem de-a face cu o poluare recentă, invers, dacă iarna cînd condițiile necesare nu sînt întrunite, dacă găsim ouă de geohelminți în fază infestantă, tragem concluzia unei poluări vechi, încă din timpul verii.

Deși pînă în prezent indicatorii utilizați pentru determinarea poluării biologice a solului nu au fost normați în nici o țară din lume, totuși cercetările diverșilor autori converg spre aceleași valori prezentate sintetic în tabelul nr. XXIII.

*Tabel nr. XXIII*

**Indicatorii poluării biologice a solului**

| *Sol* | *Nr. germeni/gr. sol* | *Titru bac. coliformi* | *Titru bac. pefringens* | *Nr. ouă geohelminți/ gr. sol* |
|---|---|---|---|---|
| Curat | sub 10 000 | 1 și peste | 0,1 | 0 |
| Slab poluat | 10 000—100 000 | 1—0,01 | 0,10—0,00 | 0—10 |
| Poluat | 100 000—1 000 000 | 0,01—0,001 | 0,01—0,001 | 10—100 |
| Foarte poluat | peste 1 000 000 | sub 0,01 | sub 0,0001 | 100 peste |

## 3.6. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A SOLULUI

### 3.6.1. Recoltarea și prelucrarea probelor din sol

Investigarea microbiologică a solului are ca scop cunoașterea stării lui igienico-sanitare și măsura în care aceasta se poate repercuta asupra altor factori de mediu (apă, alimente, aer).

De asemenea, implicarea lui ca verigă în transmiterea unor boli infecțioase cu poartă de intrare digestivă sau cutanată, impune, uneori, cunoașterea conținutului său microbian, în special în zone considerate „cu risc" de îmbolnăvire.

Se consideră zone cu risc crescut, acelea cu care omul poate realiza un contact direct sau indirect, în anumite împrejurări. Acestea sînt : locurile de joacă pentru copii, ștranduri, plaje, zone destinate turismului și agrementului, campinguri, terenuri de sport, terenuri din apropierea surselor de apă potabilă, terenuri agricole fertilizate cu îngrășăminte naturale, grădini de zarzavaturi irigate din ape de suprafață impurificate ș.a.

#### 3.6.1.1. Amplasarea punctelor de recoltare

Știind că distribuția germenilor microbieni în sol este neuniformă, atît în suprafață cît și în adîncime, pentru caracterizarea sanitară a solului este necesară realizarea unei probe medii care să fie reprezentativă pentru o suprafață de aproximativ 100 $m^2$.



Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea se face, fie de la suprafață (0,5—2 cm), fie din profunzime (20—25 cm), considerînd că acesta este stratul biologic activ al solului, în care densitatea microorganismelor de proveniență umană și animală este maximă.

Recoltarea solului pentru analiză microbiologică nu se face în timpul sau imediat după precipitații.

### 3.6.1.2. Recoltare, transport, păstrare

Recoltarea solului se realizează în borcane din sticlă cu dop șlefuit sau pungi de polietilenă neutră cu ajutorul unor linguri sau spatule metalice pentru prelevarea solului.

Materialul utilizat în vederea recoltării se sterilizează în prealabil, iar manipularea în timpul recoltării trebuie să excludă contaminarea probei sau a persoanei care efectuează recoltarea.

Dispunerea punctelor de recoltare trebuie efectuată în funcție de situația și folosința terenului, avînd în vedere poluarea prezentă sau potențială. De obicei, amplasarea punctelor se face prin dispunerea lor fie pe diagonala terenului, fie în colțurile și centrul acestuia.

Numărul eșantioanelor prelevate de pe suprafața de analizat este variabil în funcție de situația concretă din teren, în orice caz suficient pentru a permite caracterizarea sanitară a zonei care se cercetează.

Proba va avea în final o cantitate de 500—1 000 g sol, ea rezultînd din amestecul a 5—10 eșantioane a cîte aproximativ, 10—100 g fiecare, introduse succesiv în același flacon sau pungă de recoltare.

Transportul probei trebuie asigurat în timpul cel mai scurt, iar păstrarea probei, pînă la momentul însămînțării, se va face la o temperatură de + 4°C. Timpul maxim de temporizare, pînă în momentul însămînțării nu va depăși 24 h — pentru analiza microbiologică. Proba va fi însoțită de o fișă de recoltare care va cuprinde : data, ora, locul recoltării, folosința terenului, sursele de contaminare actuale sau mai vechi, precum și orice alte elemente care ar putea folosi laboratorului în cercetarea microbiologică.

### 3.6.1.3. Prelucrarea probei de sol

Avînd în vedere cantitatea mare de sol a probei, precum și dificultățile care ar rezulta din însămînțarea ei în totalitate, se impun o serie de operațiuni preliminare însămînțării dintre care, prima este aceea a omogenizării probei.

În acest scop, întreaga cantitate recoltată se introduce într-un recipient din sticlă steril (mojar sau cristalizator) și cu ajutorul unui pistil steril se realizează concomitent fărămițarea și omogenizarea probei.



Scanned with OKEN Scanner

Probele recoltate în pungi de polietilenă, pot fi omogenizate și fărămițate prin frămîntarea cu mîna, pe care s-a tras o mănușă de cauciuc sterilă.

Din proba astfel omogenizată, se cîntăresc exact 100 g sol (în mod steril) și se introduc într-un flacon cu dop șfeluit ce conține perle de sticlă, sterilizat în prealabil.

Se adaugă apoi 1 000 $cm^3$ apă sterilă (de robinet sau distilată) și se agită cu intermitență cel puțin 30 minute, pentru a se realiza, prin această spălare, o suspensie de germeni din care urmează a se face însămînțările, după cîteva minute (3—5 min) de pauză, timp în care s-au depus componentele mai grosiere din proba de sol.

### 3.6.1.4. **Pregătirea diluțiilor**

Numărul foarte mare al germenilor din sol face necesară pregătirea și utilizarea unor diluții zecimale, cu atît mai numeroase cu cît bănuim că solul are o cantitate mai mare de germeni. Gradul de diluare trebuie să țină cont de estimarea nivelului de poluare, în scopul obținerii unei densități de germeni convenabilă identificării, știut fiind că numărul de germeni din sol este foarte mare chiar și în absența poluării.

### 3.6.1.5. **Determinarea umidității solului**

Aceasta reprezintă o operațiune obligatorie în cazul determinărilor ce urmează să estimeze cantitativ anumite categorii de germeni din sol. Ea se practică în scopul exprimării încărcăturii microbiene, raportată la greutatea solului (1 g sol uscat la 105°C sau 1 g sol lipsit de umiditate).

Umiditatea se determină prin cîntărirea, la balanța analitică, a unui eșantion de 10 g din proba omogenizată, utilizînd, în acest scop, un recipient cu greutate cunoscută. Eșantionul de sol se introduce în etuvă la o temperatură de 105°C, timp de 2 ore, după care se trece în exicator, urmînd a se cîntări din nou la balanța analitică pînă la o greutate constantă.

Din diferența celor două greutăți, înainte și după uscare, rezultă umiditatea legată fizic de sol. Ea se exprimă procentual.

Acest procent de umiditate servește pentru determinarea unui factor (de corecție) K, cu ajutorul căruia se corectează rezultatele analizei microbiologice a probei. Acest factor se stabilește cu ajutorul formulei :

$$K = \frac{100}{100 - u\,\%} \qquad u = \% \text{ procentajul de umiditate a probei}$$

Corectarea rezultatelor în funcție de umiditatea solului dă posibilitatea unei exprimări standard și face posibilă compararea rezultatelor atît pentru probe de sol recoltate din zone sau puncte diferite, cît și pentru probe recoltate din același punct sau zonă, dar în perioade diferite.



Scanned with OKEN Scanner

### 3.6.2. Determinarea numărului de germeni din sol

Numărul germenilor microbieni din sol poate fi apreciat prin metode directe și indirecte :

— Metode directe

Sînt puțin utilizate în domeniul igienico-sanitar, mai frecvent acestea fiind utilizate în domeniul agrobiologiei. Ele se bazează pe numărarea germenilor dintr-o suspensie de sol, utilizînd o cameră de numărare Thomas, cu ajutorul microscopului cu contrast de fază.

Ținînd cont de înălțimea camerei și treptele de diluție, se poate face o apreciere a numărului de germeni. Metoda nu dă posibilitatea separării microorganismelor viabile de cele neviabile.

— Metode indirecte

Acestea sînt folosite în practica curentă, cu ajutorul lor apreciind microorganismele viabile într-o cantitate determinată de sol. Metoda utilizată este cea a plăcilor turnate (metoda Koch) care înglobează în mediul de cultură solid — geloza nutritivă — o cantitate de germeni în raport cu diluția însămînțată.

#### 3.6.2.1. Determinarea germenilor mezofili

Suspensia de sol diluată corespunzător, se însămînțează într-un număr de 2—3 plăci pentru fiecare treaptă de diluție, în modul următor :

După notarea corespunzătoare a plăcilor se introduce în fiecare dintre ele cîte 1 ml suspensie diluată și foarte bine barbotată, în prealabil. Peste acestea se toarnă mediul de cultură — geloza nutritivă 2%, topită și răcită la o temperatură de 40—45°C, în cantitate de 15—20 $cm^3$, așa încît să realizeze un strat de 3—4 mm grosime. După aplicarea capacului cutiei, se fac mișcări de rotație și lateralitate a plăcii, pe masă, așa încît materialul însămînțat să fie uniform înglobat și repartizat pe toată suprafața plăcii.

După solidificarea gelozei, plăcile se introduc în termostat la 37°C pentru 24 h, cu capacul în jos. Se numără apoi coloniile dezvoltate. Se iau în calcul pentru diluțiile mici, acele plăci în care densitatea coloniilor permite o numărare corespunzătoare, fără erori. Dintre plăcile însămînțate cu diluții înalte se iau în calcul acelea în care numărul de colonii dezvoltate, păstrează raportul față de precedenta diluție zecimală însămînțată.

În cazul în care pentru o diluție avem 2—3 valori rezultate din cele 2—3 plăci însămînțate pentru aceasta, se ia în calculul final media coloniilor pentru diluția respectivă.

Calculul final se face cu ajutorul formulei :

$$\text{nr. germeni } 37°C/g \text{ sol lipsit de umiditate} = \frac{\Sigma(n \cdot d)10}{N} \times K$$

$\Sigma$ = suma ;
n = nr. germeni de pe plăci ;
d = diluția respectivă a plăcii însămînțate ;

10 = corectarea nr. de germeni pentru 1 g sol brut analizat ;
N = nr. de plăci luate în calcul ;
K = coeficientul de corecție pentru 1 g sol fără umiditate (uscat la 105°C).

### 3.6.2.2. Determinarea germenilor termofili

Se utilizează aceeași tehnică de însămînțare ca și pentru germenii mezofili. Mediul de cultură va fi geloza nutritivă simplă 3% — care se păstrează solidă și la temperatura de dezvoltare a termofililor. Incubarea se va face la 56—60°C timp de 24 h. În caz de absență a coloniilor după acest interval se poate prelungi incubarea pînă la 72 h. Numărarea și calculul se fac întocmai ca și la germenii mezofili.

### 3.6.2.3. Determinarea germenilor psihrofili

Tehnica este identică cu precedentele. Se utilizează ca mediu de cultură geloza nutritivă 2% cu pH 7,2—7,6. Incubarea se face la 20—22°C timp de 48—72 h. În lipsa unui termostat adecvat se pot păstra plăcile la temperatura camerei și la întuneric. Calculul și exprimarea rezultatului se va face ca și pentru precedentele determinări.

### 3.6.2.4. Determinarea numărului de germeni sub formă de spori

Suspensia de sol diluată, înainte de însămînțare, se va inactiva la baie de apă la 80°C, timp de 20 minute, apoi se procedează la o însămînțare în volum de 1 $cm^3$ pentru fiecare diluție, în plăci Petri sterile, ca și pentru determinările anterioare. După înglobarea în geloză și solidificarea acesteia, se incubează la 37°C timp de 24 h, iar în cazul unei dezvoltări sărace sau absente, se poate prelungi timpul cu încă 24 h.

Calculul se face prin aceeași formulă ca și în determinările anterioare. Aprecierea numărului de germeni sub formă de spori din sol se face fie în valoare absolută, în raport cu numărul total de germeni mezofili dintr-un gram de sol al aceleiași probe, fie în procente față de aceștia.

Frecvența crescută a sporilor în raport cu germenii mezofili în formă vegetativă, dă posibilitatea aprecierii prezenței și vechimii procesului de poluare.

## 3.6.3. Metode de determinare a germenilor indicatori de poluare fecală a solului

### 3.6.3.1. Determinarea coliformilor totali

Apa de spălare, rezultată din 100 g sol în 1 000 $cm^3$ apă sterilă, bine omogenizată prin agitare, în flacoane cu perle le sticlă, timp de 30 minute, se lasă în repaus 3—5 minute, după care se efectuează însămînțarea.

În 5 tuburi cu mediu de cultură Mc Conkey dublu concentrat, se introduc cîte 10 $cm^3$ din apa de spălare a solului, apoi în serii de cîte 5 tuburi cu mediul Mc Conkey simplu concentrat, se introduce cîte 1 $cm^3$ din suspensia inițială, precum și cîte 1 $cm^3$ din seria diluțiilor zecimale pregătite anterior. Gradul de diluare a solului se stabilește în raport cu informațiile furnizate de fișa ce însoțește proba de sol privind folosința terenului, posibilitatea poluării fecale etc.

Tuburile însămînțate se incubează la 37°C timp de 48 h. Se consideră pozitive eprubetele în care s-a produs fermentarea lactozei, evidențiată prin virarea mediului (de la violet la galben) cu sau fără bulă de gaz în tubul Durham. Tuburile pozitive se reînsămînțează cu ansa pe mediul de confirmare E.M.B. în plăcile împărțite în sectoare. Incubarea se face la 37°C, timp de 24 h.

Coliformii dezvoltă pe acest mediu colonii negre verzui cu luciu metalic. Rezultatele obținute la acest test (număr de sectoare pozitive în raport cu diluția), se introduc în tabelele de probabilitate (Mac Crady), în vederea stabilirii numărului probabil de coliformi la 1 $dm^3$ suspensie de sol, respectiv la 100 g sol. Pentru exprimarea numărului probabil de coliformi totali pe un gram sol lipsit de umiditate, valoarea stabilită cu ajutorul tabelului, se împarte la cantitatea de sol utilizată în determinare (100 g) și se corectează cu factorul K, în vederea exprimării standard.

$$\text{Nr. probabil coliformi totali/g sol integral} = \frac{\text{Nr. din tabel}}{100} \times K$$

Exprimarea rezultatului privind coliformii, se mai practică în cazul solului prin utilizarea titrului.

În acest caz se menționează diluția cea mai înaltă din care s-a obținut dezvoltarea caracteristică coliformilor. Între numărul probabil de coliformi (index coli) și titrul coli se poate stabili o relație relativă în sensul în care, considerînd că rezultatul pozitiv al ultimei diluții s-ar datora prezenței, cel puțin a unui germene din grupul coliform, acest titru se poate transforma în index prin înmulțirea lui cu reciproca diluției.

### 3.6.3.2. Determinarea coliformilor fecali

Din tuburile pozitive pentru coliformi totali se fac treceri cu pipeta Pasteur (cîteva picături) pe același mediu Mc Conkey, simplu concentrat, care se incubează la 44°C, timp de 24 h.

Se consideră pozitive (E. coli prezent), tuburile în care s-a produs acid sau acid și gaz (virarea mediului, cu sau fără gaz, în tubul Durham). Rezultatele pozitive, pe diluții, se introduc în tabelele de probabilitate pentru stabilirea numărului probabil de coli fecal. Calculul și exprimarea finală se fac identic ca și în cazul coliformilor totali.



Scanned with OKEN Scanner

### 3.6.3.3. Determinarea streptococilor fecali (enterococi)

Asemănător determinării grupului coliform, și în cazul streptococilor fecali, se practică un test prezumtiv în care apa de spălare a solului, precum și diluțiile acestuia, sînt însămînțate pe un multiplu de 5 tuburi ce conțin un mediu de îmbogățire cu azid de Na, dublu concentrat pentru volumele de 10 $cm^3$ suspensie inițială de sol și simplu concentrat pentru volumele de 1 $cm^3$ și diluții.

Schema de însămînțare este următoarea :

— eprubete cu mediul dublu concentrat însămînțat cu cîte 10 $cm^3$ suspensie inițială.

— 5 eprubete cu mediul simplu concentrat însămînțat cu 1 $cm^3$ suspensie inițială ;

— 5 eprubete cu mediul simplu concentrat însămînțat cu 1 $cm^3$ diluție 1/10 ;

— idem pentru diluțiile următoare.

Ultima diluție însămînțată va fi cu 1—2 ordine mai mică decît cele utilizate pentru colimetrie.

Incubarea se face la temperatura de 37°C timp de 48 h.

Se consideră pozitive mediile care se tulbură și prezintă depozit pe fundul eprubetei.

Tuburile pozitive se reînsămînțează cu pipete Pasteur (cîteva picături) în mediul de confirmare (azid de sodiu și brom crezol purpuriu). Se incubează la 37°C, timp de 24 h. Se consideră pozitive tuburile în care culoarea mediului virează de la violet la galben și prezintă depozit pe fundul eprubetei.

Rezultatele testului de confirmare (cu tuburi pozitive pe diluții), se introduc în tabelele Mac Crady, iar calculul și exprimarea rezultatelor se fac ca și pentru coliformi, în index sau titru.

### 3.6.3.4. Determinarea germenilor sulfito-reducători

Apa de spălare a solului, precum și diluțiile respective se inactivează la baia de apă la 80°C timp de 20 minute.

Se însămînțează din fiecare diluție cîte 2 eprubete ce conțin mediu de cultură cu sulfit de Na, lichid sau solid. Mediile de cultură se regenerează în prealabil, prin fierbere 20—30 minute într-o oală cu apă în care s-au introdus eprubetele. Se lasă să se răcească pînă la aproximativ 50°C, după care se însămînțează cu pipeta, introducînd cîte 1 $cm^3$ la fundul tubului, lăsînd să curgă liber cantitatea de însămînțat, fără a sufla în pipetă. Este bine să folosim pipete de 2 $cm^3$ care ne permit asigurarea cantității necesare însămînțării fără a sufla în pipetă. După aceasta, tubul se cufundă într-un vas cu apă rece în vederea solidificării rapide. Înainte de aceasta se poate introduce în fiecare tub însămînțat o cantitate de ulei de parafină sterilizat, care să realizeze un strat de 5—10 mm la suprafața mediului în vederea creării unor condiții de anaerobioză.

Tuburile se incubează la 37°C.



Scanned with OKEN Scanner

Clostridiile sulfito-reducătoare modifică culoarea mediului care devine negru în totalitate (mediul lichid), sau dezvoltă colonii de culoare neagră, în grosimea mediului solid. Dezvoltarea cea mai precoce o are Clostridium perfringens care își dezvoltă acțiunea de reducere a sulfitului de Na la 37°C în 18 ore. Celelalte clostridii se dezvoltă în 24 h și mai tardiv.

Coloniile izolate ale clostridiilor au următoarele caracteristici :

Clostridium perfringens : colonii biconvexe, formă de brioș sau inimă ;

Clostridium aedemanties : colonii ca o grenadă în explozie (jumătate compactă cu margine regulată, jumătate arborescentă) ;

Clostridium septicum : colonii arborescente cu tendință de expansiune rapidă ;

Clostridium histoliticum : colonii mici, opace, lenticulare ;

Clostridium sporogenes : colonii sub formă de păpădie, cu tendință la fuzionare.

Bacteriile sulfito-reducătoare se exprimă prin titru, menționînd treapta cea mai înaltă de diluție la care au apărut colonii caracteristice în mediul de cultură Titrul se poate transforma în index ca și în cazul germenilor coliformi.

Un test de confirmare și identificare pentru Clostridium perfringens este coagularea caracteristică a laptelui. În acest scop, fie din diluțiile inactivate, fie din coloniile caracteristice dezvoltate pe mediul solid se însămînțează în eprubete ce conțin mediul de cultură, lapte turnesolat, generat prin fierbere în prealabil. Se incubează la 37°C timp de 24 h. Clostridium perfringens produce înroșirea laptelui, datorită acidificării prin fermentarea lactozei și coagularea lui, cheagul fiind sfîșiat de gazele rezultate. Cheagul este lipit de unul din pereții eprubetei, iar locul rămas liber este umplut de un lichid limpede-gălbui. Alteori, cheagul are aspectul unui burete de culoare roșie, lipit de pereții eprubetei.

### 3.6.3.5. **Determinarea bacteriofagilor enterici (tehnica prin îmbogățire)**

Suspensia de sol se însămînțează în volume de 30 $cm^3$, 10 $cm^3$, 5 $cm^3$, 1 $cm^3$ și 0,1 $cm^3$ din diluții, în flacoane și eprubete ce conțin mediul Hottinger.

Se pregătesc două asemenea serii : una va fi îmbogățită cu tulpina de Escherichia coli Bruxelles, cultivată în bulion timp de 24 h la 37°C, cîte 0,5 ml. în fiecare recipient (flacon sau eprubetă), iar cea de a doua serie va fi îmbogățită în același mod cu tulpina de Salmonella typhi A., cultivată în aceleași condiții.

Aceste preparate, se incubează la termostat la 37°C timp de 12—16 h.

Urmează operația de separare a bacteriilor de eventuali fagi enterici dezvoltați. Acest lucru se face prin căldură, la baia de apă la o temperatură de 56°C timp de 50 minute.

După distrugerea germenilor, urmează evidențierea bacteriofagilor omologi în felul următor : pe suprafața plăcilor ce conțin geloza bine



Scanned with OKEN Scanner

uscată, se însămînțează cu ansa, formînd rondele din tulpinile lizosensibile de Escherichia coli și Salmonella typhi cultură de 3 ore, astfel încît fiecărui recipient însămînțat să-i corespundă cîte o rondelă cu E. coli și una cu S. typhi. După uscarea acestora, se depune cu ansa, în centrul lor, cîte o picătură din preparatele fagice îmbogățite.

După ce mediul a absorbit preparatul fagic, plăcile se incubează la 37°C, timp de 5—6 ore. După o citire prezumtivă, se păstrează la +4°C și se citesc definitiv la 24 h. Se apreciază prezența diferitelor forme de liză (confluență, semiconfluență, plaje), raportînd la cantitatea de sol însămînțată.

## 3.6.4. Metode de determinare a germenilor patogeni din sol

### DETERMINAREA ENTEROBACTERIILOR PATOGENE

Testele cele mai folosite privind poluarea solului cu germeni patogeni, sînt cele utilizate pentru izolarea și identificarea enterobacteriilor patogene, genurile Salmonella, Shigella și Escherichia coli enteropatogen.

Metoda de lucru : din proba de sol recoltată, fărămițată și omogenizată, se ia cu o linguriță sterilă, aproximativ 10 g sol (2 linguriță) și se introduc în cîte 2 balonașe sterile pentru fiecare mediu de îmbogățire (mediu cu selenit de sodiu sau Müller Kauffman). Se adaugă apoi, aproximativ 80 ml mediu în fiecare balonaș și se agită în timp de 30 minute de cîteva ori, pentru a spăla bine solul în mediul de îmbogățire.

O serie de balonașe se incubează la 37°C, iar cea de a doua la 20—22°C (teperatura camerei). Timpul de incubare va fi de 24—72 ore.

La intervale de 24—48—72 ore se fac dispersii din mediul de îmbogățire pe medii solide selectiv-diferențiale pentru obținerea de coloniii izolate (Leiffson, Istrati-Meitert, geloză lactozată și albastru de bromtimol) (tabelul nr. XXIV).

La aceleași intervale de timp se procedează la reîmbogățirea culturilor astfel : din balonașele însămînțate inițial se preiau cu pipeta Pasteur 2—3 picături și se introduc în eprubete ce conțin mediu de îmbogățire. Incubarea acestora se face, de asemenea, la 37°C și 20—22°C. În continuare, se procedează la dispersii pe medii selectiv-diferențiate și din a doua serie de culturi de îmbogățire, care, de asemenea, se incubează la 37°C timp de 24 h după care se păstrează la temperatura camerei încă 2—3 zile sub observație.

— Coloniile suspecte lactozo-negative se izolează pe geloză simplă sau geloză TSI și mediul MIU (mobilitate-indol-uree), după care se procedează la identificarea lor prin aglutinare cu seruri specifice după schemele obișnuite folosite în diagnosticul bacteriologic al produselor patologice, pentru confirmarea de Salmonella, Shigella și Escherichia coli.

— Coloniile lactozo-pozitive caracteristice sînt, de asemenea, izolate pe geloză simplă și supuse identificării serologice în vederea depistării prezenței Escherichiei coli serotipuri patogene sau Salmonelle atipice.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XXIV*

**Aspectul coloniilor pe mediile selective folosite pentru izolarea enterobacteriilor**

| *Mediul* | *Aspectul coloniilor* | | |
|---|---|---|---|
| | *lactozo +* | *lactozo —* | |
| M. Leiffson | colonii roșii (E. coli) | colonii necolorate transparente colonii mate cu centrul negru | — Salmonella<br>— Shigella<br>— Proteus |
| M. Istrati-Meitert | colonii galbene (E. coli) | colonii albastre-verzui transparente centrul negru (ochi de pisică) | — Shigella<br>— Proteus |
| Geloză-lactoză albastru de brom-timol | colonii galbene virează mediul în galben (E. coli) | colonii albastre semitransparente | — Salmonella<br>— Shigella<br>— Proteus |

— În ceea ce privește depistarea de Escherichia coli patogen se pot face izolări pe geloză pornind direct de la mediul de confirmare EMB.

— Concomitent cu izolarea pe geloză simplă, coloniile suspecte lactozo-pozitive și negative se pot trece pe medii de identificare multitest ca cele preparate și recomandate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino" (TSI și MIU) (tabel nr. XXV).

*Tabel nr. XXV*

**Diferențierea Enterobacteriaceelor prin folosirea mediilor multitest — TSI și MIU**

| *Genul* | *TSI* | | | *MIU* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *$H_2S$* | *Gaz din glucoză* | *lactoză zaharoză* | *mobilitate* | *indol* | *uree* | *Obs.* |
| Salmonella (inclusiv Arizona) | ++ | + | — | + | — | — | |
| Salm. typhi | ± | ±/— | — | + | — | — | |
| Citrobacter | +/— | + | +/— | + | — | — | |
| Escherichia | — | + | + | +/— | + | — | |
| Shigella | — | — | — | — | d | — | Shigella sonnei lactozo + |
| Klebssiella | — | +++ | + | — | — | + | |
| Enterobacter | — | +++ | + | + | — | — | |
| Serratia | — | —/± | — | + | — | — | |
| Proteus | ++/— | + | — | + | +/— | + | Proteus mirabilis indol + |
| Providencia | — | + | — | + | + | — | |
| Yersinia enterocolitica | — | + | — | —/37°<br>+/30° | +/— | + | |

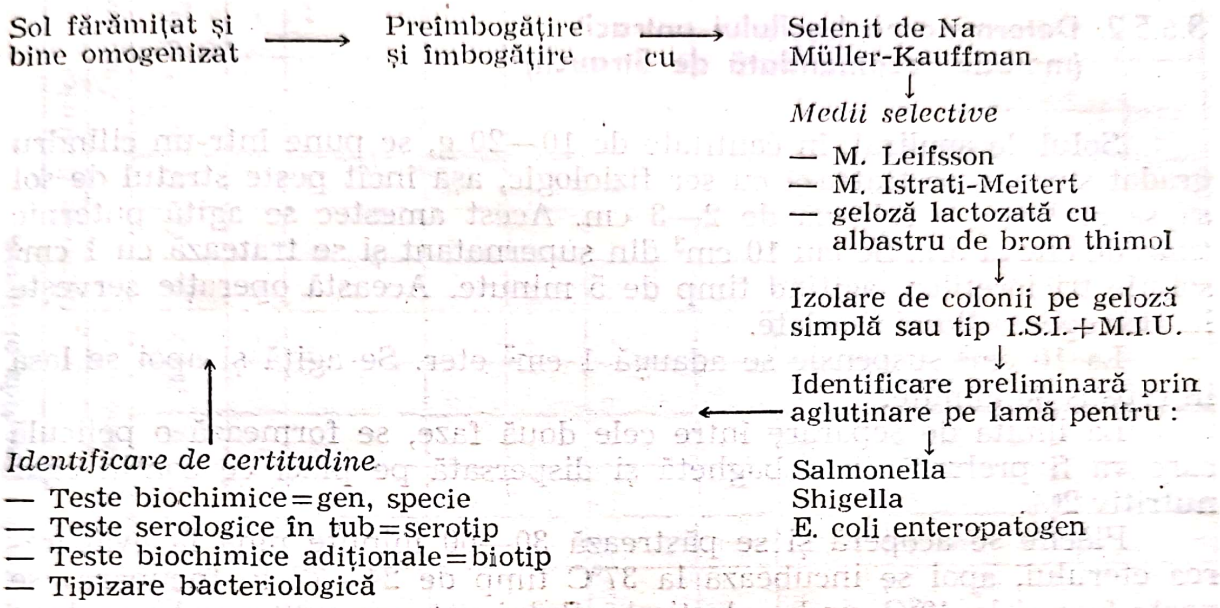


Scanned with OKEN Scanner

Modul de izolare și identificare a enterobacteriaceelor este prezentat în schema 2.

*Schema 2*

**Schema de izolare și identificare a enterobacteriaceelor din sol**




După identificarea preliminară prin aglutinare pe lamă cu seruri polivalente și monovalente, tulpinile izolate pot fi trimise Institutului „Dr. I. Cantacuzino", laboratorul de Enterobacteriacee, în vederea identificării de certitudine.

## 3.6.5. Determinarea germenilor sporulați cu poartă de intrare cutanată

### 3.6.5.1. Determinarea Clostridium tetani

Evidențierea Clostridium tetani în sol se face utilizînd proba biologică.

O cantitate de aproximativ 50 g sol din proba omogenizată se usucă timp de 24 h la 37°C. Din aceasta se iau 10 g sol și se introduc în 20—30 $cm^3$ ser fiziologic steril, se agită bine și se inactivează apoi la 80°C timp de 30 minute.

Suspensia se filtrează prin hîrtie de filtru și apoi se face un amestec de 0,5 ml. filtrat cu 5—8 mg. clorură de calciu conținută în 0,1 ml apă distilată sterilă. Acest amestec se injectează subcutanat în laba posterioară a unui șoarece alb sau intraperitoneal. Pentru fiecare probă se inoculează cel puțin două animale.

Un alt eșantion de suspensie din probă se amestecă cu 0,1 ml dintr-o doză preventivă de ser antitetanic și se injectează, de asemenea, la 2 șoareci albi. Fiecare animal primește 0,5 ml probă + 0,1 ml clorură de calciu + 0,1 ml ser antitetanic.



Scanned with OKEN Scanner

Probele care conțin un număr minimal de spori vor provoca moartea animalelor în 1—4 zile, cu fenomene de intoxicație tetanică, în timp ce aceleași probe neutralizate prin serul omonim, nu vor provoca moartea animalelor.

### 3.6.5.2. Determinarea bacilului antracis (metoda recomandată de Strauch)

Solul de analizat, în cantitate de 10—20 g, se pune într-un cilindru gradat steril și se tratează cu ser fiziologic, așa încît peste stratul de sol să se realizeze o coloană de 2—3 cm. Acest amestec se agită puternic timp de cîteva ore. Se iau 10 $cm^3$ din supernatant și se tratează cu 1 $cm^3$ soluție tricloretilen, agitînd timp de 5 minute. Această operație servește la distrugerea florei asociate.

La 10 $cm^3$ suspensie se adaugă 1 $cm^3$ eter. Se agită și apoi se lasă în repaus 30 minute.

La limita de separare între cele două faze, se formează o peliculă care va fi preluată cu o baghetă și dispersată pe plăci ce conțin agar nutritiv 2%.

Plăcile se acoperă și se păstrează 30—60 minute pînă la evaporarea eterului, apoi se incubează la 37°C timp de 24—72 h. Incubarea se poate face și la 40°C, unde selecția bacilului antracis este mai bună decît la 37°C, unde se dezvoltă și alți germeni. Se consideră însă că 20% din spori ar putea să nu se dezvolte la această temperatură. După acest interval se cercetează coloniile dezvoltate, bacilul antracis prezentînd o dezvoltare tipică cu colonii cu aspect de meduză. Acestea vor fi izolate și cercetate în vederea identificării prin cultivare în bulion, unde produc turbiditate difuză și formează peliculă la suprafață ; pe agar sînge, pe care nu produc hemoliză, spre deosebire de bacilul cereus și alți bacili aerobi saprofiți. De asemenea, caracteristică este și lichefierea gelatinei drepte, în formă de brad inversat.

Altă metodă de izolare recomandă inactivarea suspensiei de sol în ser fiziologic la 60—70°C timp de 10 minute pentru distrugerea florei asociate sau cultivarea suspensiei de sol în bulion la 37°C timp de 24 h., după care germenii de asociație se distrug prin încălzirea culturii în bulion la 60—70°C timp de 30 minute. După aceasta, cultura se însămînțează pe geloză 2% sau se face proba biologică.

Animalul cel mai receptiv este șoarecele. Inocularea parenterală duce la septicemie cărbunoasă în 1—3 zile.

## 3.6.6. Determinarea prezenței genului Candida în sol

Tehnica de recoltare și prelucrarea probelor de sol se face în același mod ca și pentru analiza microbiologică. Suspensia de sol ce urmează a fi însămînțată rezultă din 100 g sol bine omogenizat și 1 000 ml apă distilată sterilă, agitată timp de 30 minute într-un flacon cu perle de sticlă.



Scanned with OKEN Scanner

## Caractere de cultură și biochimice ale speciei Candida albicans

| *Specia* | *Colonii pe mediul Sabouraud* | *Caractere de cultură* | | | | *Caractere fiziologice* | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | *Zimograma* | | | | | | *Anxograma* | | | | | | | |
| | | *Coloniile pe geloză-sînge* | *Văl* | *Sul* | *Depozit* | *G* | *GL* | *L* | *M* | *R* | *Z* | *G* | *L* | *M* | *R* | *Z* | $NO_3K$ | *Alcool 3%* | *Clamidospori* |
| C. albicans | Colonii cremoase | Albe-cenușii | − | − | + | + | + | − | + | − | − | + | − | + | − | + | − | − | + |
| C. tropicalis | Aspect variabil | Franjuri pseudo micelii în jurul coloniilor | + | + | + | + | − | − | + | − | + | + | − | + | − | + | − | ± | − |
| C. pseudo-tropicalis | Colonii cremoase | Colonii mici | − | ± | + | + | − | + | − | + | + | + | + | − | + | + | − | + | − |
| C. Krusei | Colonii uscate | Albe-cenușii mici | + | ± | − | + | − | − | − | − | − | + | − | − | − | − | − | + | − |
| C. Quillermondi | Colonii cremoase uneori plisate | | ± | + | + | + | − | − | − | + | + | + | − | ± | + | + | − | + | − |
| C. Parekrusi | Colonii cremoase | Albe-perlate rotunde plate | ± | + | + | + | − | − | − | − | − | + | − | + | − | + | − | − | − |
| C. Intermedia | Cremoase cu margini neregulate | | + | + | + | + | + | − | + | + | + | + | + | + | + | + | − | − | − |
| C. Stelatoides | Colonii cremoase | Aspect stelat cu centrul ridicat cu prelungiri radiare | − | + | + | + | − | − | + | − | − | + | − | + | − | − | − | + | + |
| C. Eurvate | Colonii gălbui ușor plisate | | + | + | + | − | − | − | − | − | − | + | + | + | − | + | − | + | − |
| C. Zeylanoides | Colonii albe cenușii | | ± | + | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | + | − |

*Tehnica însămînțării :* 1 ml suspensie se depune pe suprafața unei plăci cu mediu de cultură Sabouraud cu antibiotice și se etalează cu o spatulă de sticlă sterilă. Se introduce în termostat la 37°C cu capacul întredeschis pînă la uscarea suprafeței, după care se închide capacul. Incubarea se face în poziția plăcii cu capacul în sus, iar timpul de incubare este de 24, 48, 72 h, după fiecare interval în parte, notîndu-se apariția coloniilor cu următoarele caractere :

— Colonii cremoase alb-cenușii, de diferite dimensiuni, cu margini neregulate, uneori cu aspect plat sau colonii cu aspect stelat cu centrul ridicat și prelungit radiare sau colonii rotunjite, plate, albe paralele cu consistență cremoasă.

Din fiecare tip de colonii, suspectă a fi din genul Candida, se practică examen microscopic direct, în preparat proaspăt între lamă și lamelă. În acest mod se stabilește prezența de celule levurice înmugurite sau mai rar prezența de pseudomicelii. Tipurile de colonii confirmate prin examenul microscopic sînt, în parte, dispersate în suprafață pe cîte o placă cu mediul Sabouraud, fără antibiotic și incubate la 37°C timp de 24 h, după care colonii — absolut caracteristice — se repică pe același mediu Sabouraud, în tuburi.

Tuburile cu tulpini astfel obținute, se pot stoca sau diagnostica imediat, prin stabilirea caracterelor morfo-fiziologice și biochimice pentru Candida albicans (tabel nr. XXVI).

## 3.6.7. Determinarea fungilor patogeni din sol

### 3.6.7.1. Determinarea dermatofiților din sol

Izolarea dermatofiților din sol se face după tehnica lui Vanbgreucghem, pusă la punct de Evolceenn și colaboratorii, care are la bază proprietățile keratinofile ale acestor fungi.

*Recoltarea* probelor de sol se face în aceleași condiții ca și pentru analiza microbiologică.

*Metoda de determinare :* Proba de sol, bine onogenizată, se așază în cutii Petri, peste care se adaugă apă bidistilată, pînă cînd proba se acoperă cu o peliculă fină. Pe suprafața peliculei de apă se așază firele de păr spălate și sterilizate anterior (firele de păr se lasă în apă de robinet 48 ore, se călesc cu apă distilată, se usucă în etuvă, se împachetează în hîrtie și se sterilizează în autoclav 1 oră la 120°C). Cutiile Petri cu solul și firele de păr se incubează la 37°C timp de 7 pînă la 14 zile, examinîndu-se zilnic, macroscopic și microscopic, după primele 7 zile.

Cercetarea micologică a materialului (firele de păr) incubat se poate face prin :

— Examen microscopic direct
— Diagnostic prin culturi

*Examenul direct :* dă diagnosticul de orientare asupra materialului micologic. Aceasta se realizează între lamă și lamelă. Înaintea examinării, firele de păr trebuie „clarificate“ sau „disociate“ cu ajutorul unor substanțe disociante ce topesc celulele cornoase, făcînd vizibilă prezența paraziților criptogamici. Ca substanțe disociante se pot folosi : KOH în



Scanned with OKEN Scanner

soluție apoasă 30—40% sau sulfura de sodiu 10% (Natrium sulfuratum 1 g), alcool pur 2,5 ml, apă distilată 7,5 ml). Pentru examinarea microscopică, firele de păr se așază cu ajutorul unei pensete sterile în centrul lamei, bine degresată, peste care se pun 1—2 picături din soluția disociantă, totul acoperindu-se cu o lamelă. Excesul de substanțe care depășește marginile lamelor se va absorbi cu o hîrtie de filtru. Disocierea durează 2—5 minute, după care se face examinarea extemporanee la microscop — începînd cu un obiectiv mai clar (ob. 3) și, de obicei, cu diafragmul închis, la lumină naturală. După precizarea imaginii de ansamblu a prezenței elementelor micotice, schimbăm obiectivul cu unul mai puternic (ob. 7), deschizînd puțin diafragmul. Examinarea cu imersie nu este necesară. Perii parazitați se deosebesc de cei sănătoși, în cîmpul microscopic, în primul rînd, prin culoarea lor mai închisă și apoi prin prezența elementelor fungice care sînt filamente miceliene sau artrospori.

Filamentele miceliene sau hifele, sînt asemănătoare unor tuburi alungite, ramificate sau neramificate, celule cu conținut citoplasmatic și cu membrană rezistentă. Artrosporii, forme de rezistență, au formă dreptunghiulară sau rotunjită caracteristică.

## DIAGNOSTICUL PRIN CULTURI

Examenul direct al produsului de cercetat reprezintă primul timp în precizarea prezenței dermatofiților ; precizarea speciei ciupercii patogene se face cu ajutorul culturilor.

*Mediul de cultură* folosit este mediul Sabouraud „clasic", căruia, pentru a împiedica dezvoltarea saprofiților piogeni banali, îi adăugăm antibiotic (penicilină 5 000 u.i./ml mediu sau tetraciclină 10 μg/100 ml mediu lichid — în momentul răcirii mediului).

Firele de păr, care la examenul direct au apărut suspecte, de a fi parazitate, se spală repede într-o soluție de ser fiziologic steril, pentru a înlătura urmele substanței disociante și le fragmentăm în particule mai mici pe o lamă de sticlă cu ajutorul unei lame de ras ; se ridică cu vîrful ansei de platină (îndoită în unghi drept), sterilă prin flambare și se depun pe suprafața mediului de cultură în puncte diferite, la distanțe aproximativ egale (cu 3—4 fragmente pentru un tub). Însămînțarea trebuie făcută rapid spre a nu favoriza eventuala contaminare din exterior cu alți fungi. Tuburile însămînțate se păstrează la termostat la 37°C, durata variind de la o specie la alta — urmărindu-le macroscopic pe o perioadă de 7—21 zile.

Pentru observarea și studierea particularităților microscopice ale unei culturi, se recoltează un mic fragment din colonia dezvoltată și se examinează la microscop, între lamă și lamelă, după disocierea lui într-o picătură de potasă caustică sau cloral-lacto-fenol.

Recunoașterea macroscopică și microscopică se face după caracterele de cultură particulare fiecărei specii în parte :

*Trichophyton gypseum* (Trichophyton mentagrophytes asteroides) își datorește numele aspectului gipsos al suprafeței culturii sale. Macroscopic, colonia este de culoare alb-gălbuie cu centrul uneori puțin ridicat, a cărei masă pulverulentă se detașează ușor de mediul de cultură.



Scanned with OKEN Scanner

Macroscopic, prezintă numeroase aleurii (elemente celulare de 3 μ), rotunde sau piriforme, legate de miceliu direct sau printr-un mic pedicul. Dispoziția aleurilor poate fi izolată sau în spic, fusurile (macronidile) sînt rare și rotunjte la capete.

*Trichophyton mentagrophytes-interdigitalis* se aseamănă cu varietatea de mai sus cu deosebire că macroscopic, aspectul coloniei este ceva mai pufos și prezintă pigment brun-violet, vizibil în grosimea mediului. Microscopic, se văd foarte numeroase aleuri, fusuri rotunjite la capete, asemănătoare cu Trichophyton mentagrophytes asteroides.

*Trichophyton quinkeanum* — macroscopic, coloniile sînt asemănătoare cu ale speciei Trichophyton mentagrophytes, dar sînt mai pufoase și mai catifelate. Microscopic prezintă filamente miceliene caracteristice : aleurii numeroase, dispuse sub formă de cîrcei, iar fusurile mai rare.

*Microspirum gypseum* — specie întîlnită des ca saprofit în sol, și care, rar, ajunge ca agent patogen la om ; se caracterizează printr-o creștere rapidă pe mediul de cultură ; coloniile cu aspect gipsos, de culoarea cafelei cu lapte, cu marginile foarte pufoase și albicioase. Microscopic, prezintă filamente miceliene sub formă de rachetă ; aleurii ovolare și extrem de numeroase fusuri, ușor rotunjite la capete (apar foarte precoce în cultură).

### 3.6.8. **Determinarea geohelminților din sol**

Pentru examenul parazitologic al solului se recomandă ca recoltarea probelor de sol să se facă din locurile presupuse infestate, atît de la suprafață (0,5—2 cm), cît și din profunzime (20—25 cm).

### 3.6.8. **Determinarea geohelminților din sol**

Tehnica recoltării și omogenizării probelor de sol se face în același mod ca și pentru analiza microbiologică.

Se analizează 50 pînă la 100 g de sol bine omogenizat. Se adaugă o cantitate dublă de hidrat de sodiu sau potasiu 5% care are rolul de a separa ouăle de paraziți de particulele de sol și se lasă în repaus o oră. Se agită amestecul bine cu agitatorul magnetic timp de 10 minute. Se centrifughează la 200—300 turații/minut, timp de 1—2 minute, îndepărtîndu-se apoi lichidul supernatant prin decantare. Sedimentul obținut după centrifugare i se adaugă o soluție saturată de azotat de sodiu cu densitatea de 1,19 care are rol de a antrena ouăle la suprafața amestecului.

Se centrifughează la 200—300 turații/minut de 5—6 ori, timp de 1—2 minute, de fiecare dată recoltînd peliculele din stratul superficial, cu o ansă sau baghetă de sticlă în formă de L. Peliculele recoltate se adună într-o cuvă de centrifugă de 10 $cm^3$, care conține 1 $cm^3$ ser fiziologic sau apă distilată. Se centrifughează 15 minute tot la turația de 200—300/minut. La sfîrșit, supernatantul se sifonează cu o pipetă prevăzută cu o pară de cauciuc și se va examina în întregime în preparat proaspăt la microscop, notînd numărul și specia de geohelmint. După numărul ouălor de paraziți se stabilește calitatea solului din punct de vedere parazitologic.



Scanned with OKEN Scanner

### 3.6.8.2. Metoda Kato și Miura

Dreptunghiuri de celofan cu dimensiuni de 3/4 cm se cufundă și se mențin, cel puțin 24 h în soluția de lucru Kato, înainte de utilizare și în continuare, timp indefinit. Se ia cu o baghetă de sticlă o cantitate de sol bine omogenizat din probă și se așază pe o lamă de sticlă. Se ridică cu o pensă un dreptunghi de celofan din soluția Kato și se așază peste lama cu solul omogenizat. Se presează celofanul cu un corp tare (dop de cauciuc) pînă cînd preparatul devine plat, iar sub celofan materialul prezintă de diametrul aproximativ 1,5—2,5 cm. Se lasă preparatul 30 minute pe masă. Se examinează la microscop cu obiectivul 10 și 40, ridicînd condensatorul și utilizînd în special viza macrometrică a lunetei microscopului.

Ouăle de Ascaris lumbricoides sînt ușor decelabile, dar pot avea deseori membrana mamelonată estompată.

### 3.6.8.3. Metoda Bailenger

Principiul tehnicii : elementele parazitare sînt concentrate prin centrifugare dintr-o suspensie aceto-acetică și eter cu pH = 5.

Tehnica de lucru : Se pun 10—20 g sol din proba de sol omogenizată (în proporție de 1/10), soluție aceto-acetică, într-o sticlă cu dop rodat. Se adaugă perle de sticlă și se agită bine, repetat. Se lasă să sedimenteze 1—2 minute. Se adaugă un volum egal de eter și se agită din nou bine. Se centrifughează 3 minute la 1 500—2 000 turații/minut. După centrifugare se formează în eprubetă 4 straturi (fig. 11).

Se desprinde cu un vîrf de pipetă Pasteur stratul central din resturi rezistente (stratul 3 din fig. 11) intermediar de pe pereții eprubetelor de centrifugă, apoi se decantează brusc lichidul. Se examinează sedimentul, prelevat cu o pipetă Pasteur, între lamă și lamelă. Metoda este greoaie, de aceea se utilizează rar.

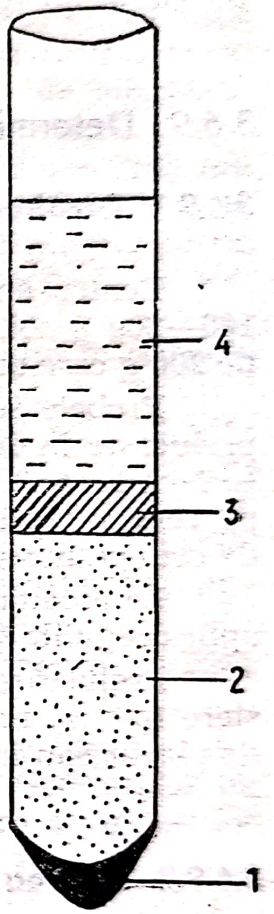



*Fig. 11* — Preparatul Bailenger : 1 — sedimentul ; 2 — stratul de suspensie acidă ; 3 — un depzit central alcătuit din resturi mai rezistente ; 4 — un strat de eter superior, cu grăsimi dizolvate

### 3.6.8.4. Metoda Willis-Hung

Se bazează pe dubla proprietate a ouălor ușoare de Ascaris (ouăle fecundate), aceea de a putea pluti la suprafața soluției de NaCl saturată și aceea de a adera la suprafața lamei de sticlă.

Tehnica de lucru : Solul recoltat și omogenizat la fel ca în analiza microbiologică se amestecă cu soluție suprasaturată de NaCl, în proporții de 1/5 în paharul cilindric. Amestecul se filtrează pe sită și pîlnie în



Scanned with OKEN Scanner

pahar Erlermayer, încet, pe pereții vasului, fără a se face spumă, pînă se formează un menisc convex. Se așază cu grijă o lamelă și se lasă să plutească 30 minute, perioadă în care ouăle au timp să se ridice. După 30 minute, lamela se ridică cu o pensă, ținîndu-se tot timpul orizontal, fără să o înclinăm (altfel se scurge pelicula de lichid de pe suprafața interioară). Lamela se așază pe o lamă și se examinează la microscop cu obiectivul 8 sau 40.

## 3.6.9. Determinarea virusurilor din sol

### 3.6.9.1. Recoltarea probelor

Pentru analiza virusologică a solului sînt necesare cantități de 100—200 g sol. Probele recoltate se amestecă obținîndu-se probe medii de 200 g care se trec în borcane cu dop șlefuit sau pungi de plastic sterile.

Probele se transportă în cel mai scurt timp la laborator, unde sînt prelucrate în 24 ore de la recoltare. Păstrarea probei pînă la prelucrare se face la +4°C. Probele trimise la laborator sînt însoțite de către o fișă pe care se notează locul și data recoltării, folosința terenului și sursele de contaminare.

La recoltarea probelor și în cursul prelucrării lor în laborator se vor aplica regulile de asepsie la fel ca la examenul bacteriologic.

Prelucrarea probelor se face după îndepărtarea materialelor grosiere (pietre, resturi vegetale, bucăți de lemn) și omogenizarea în punga de plastic sau într-un mojar cu pistil.

### 3.6.9.2. Eluarea și concentrarea virusurilor

Eluarea virusurilor, adsorbite pe particulele de sol, reprezintă momentul cel mai important în procesul de izolare a virusurilor din sol.

În primele cercetări pentru eluarea virusurilor s-a utilizat serul fiziologic, apă distilată, soluțiile proteice și altele. În ultimii ani s-a acordat o atenție deosebită izolării virusurilor din nămoluri evacuate din stațiile de tratare și din sedimente acvatice de rîu sau marine. Metodele utilizate pentru eluarea și concentrarea virusurilor din astfel de nămoluri sînt asemănătoare cu cele utilizate pentru sol, iar unele pot fi adaptate pentru investigarea virusologică a solului.

Experimentînd 14 eluenți pentru desorbția virusurilor din nămoluri de apă reziduală, Grigorieva și Korciak au constatat că cel mai eficient a fost bulionul de carne-peptonă în amestec cu fosfat disodic 10% la pH 8,2—8,8.

Foarte eficienți sînt eluenții conținînd extract de carne 10% sau chiar 20%, eluția fiind urmată de o a doua fază de concentrare prin metoda flocurării organice sau hidroextracție ; au mai fost utilizați cu bune rezultate, cazeina, ureea, serul de vițel.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru eliberarea virusurilor legate de particulele solide a fost aplicat cu rezulate foarte bune tratamentul cu ultrasunete și extracția cu freon combinată cu hidroextracția cu polietilen glicol, aceasta fiind și propusă ca tentativă standard pentru determinarea prezenței virusurilor în nămoluri.

În anul 1979 Hurst și Gerba au experimentat o metodă de concentrare a virusurilor din sol, bazată pe eluarea virusurilor cu ajutorul unei soluții puternic alcaline (tampon glicină cu pH 11,5 asociat cu EDTA, urmată de neutralizarea eluentului și de o concentrare cu hidroxid de aluminiu.

Metoda constă din următoarele faze :

1. Eluția virusurilor : se amestecă 25 g sol cu 4 volume (100 ml) eluent constituit din tampon glicină 0,25 M asociat cu EDTA 0,05 M la pH 11,5. Amestecul sol-eluent se agită puternic timp de 4 minute pe un agitator magnetic, apoi o centrifugare 5 minute la 1 400×g. În supernatantul care se reține, se adaugă soluție de $AlCl_3$ 1 M pînă la obținerea concentrației finale de 0,06 M. Urmează neutralizarea pH-ului prin adaos de tampon glicină 1,0 M la pH 2,0.

2. Concentrarea virusurilor din eluatul de sol. După acidifiere la pH 3,5 se formează un precipitat de hidroxid de aluminiu care se separă prin centrifugare. Precipitatul se resuspendă în ser fetal de vițel, iar supernatantul se concentrează prin adsorbție pe membrane filtrante (Filterite) cu porozitate de 3,0 și 0,45 μm. Eluantul de pe filtre (tampon glicină și FDTA cu pH 11,5) se inoculează.

Metoda descrisă a avut eficiență bună, permițînd recuperarea a 72% din virusuri.

În cercetările efectuate în țara noastră pentru eluarea virusurilor din sol s-a utilizat bulionul de carne cu fosfat disodic 10% recomandat de Grigorieva și Korciak după care s-a efectuat o concentrare a virusurilor aplicînd metoda adsorbției pe celule de levură de bere.

Metoda are următoarele etape de lucru :

a) *Eluarea virusurilor* : ca eluent se utilizează bulionul de carne cu fosfat disodic avînd următoarea compoziție : 10 g extract de carne, 10 g peptonă, 100 g fosfat disodic ; se completează la 1 000 ml cu apă distilată, se ajustează la pH 8,6—8,8 și se sterilizează prin autoclavare.

Pentru eluare se iau 50 g din proba de sol peste care se adaugă 500 ml eluent. Amestecul se agită timp de 60 minute la agitatorul mecanic la o frecvență de 270 oscilații/minut, după care se lasă în repaus 10—15 minute pentru sedimentarea spontană a particulelor de sol. Eluentul de sol este în continuare limpezit prin centrifugare la 3 000 turații/minut timp de 30 minute, iar supernatantul se decantează și se aduce la pH neutru cu cîteva picături de acid acetic glacial sau cu soluție de HCl 0,1 N.

Din supernatantul neutralizat se reține o cantitate de 10 ml pentru investigare virologică directă fără concentrare.

b) *Concentrarea virusurilor* se aplică în cazul în care se presupune o impurificare virală redusă, utilizînd una dintre metodele recomandate pentru concentrarea virusurilor din apă. Recomandăm metoda de concentrare pe celule de levură de bere descrisă de Nestor.



Scanned with OKEN Scanner

Din eluatul de sol se iau 250 ml, se ajustează pH-ul la valoarea 6,0—6,5 și se adaugă 1 ml din suspensia de celule de levură de bere. Amestecul este agitat apoi cu ajutorul unui agitator magnetic timp de 30 minute, supernatantul se îndepărtează, iar sedimentul este reluat cu 5 ml bulion bacteriologic și agitat manual timp de 10 minute. După o nouă centrifugare la 2 500 turații/minut timp de 15 minute se prelevează supernatantul care reprezintă concentratul de virus.

### 3.6.9.3. Decontaminarea probelor

Pentru inactivarea bacteriilor prezente în eluent și în concentratele obținute după aplicarea operațiunilor descrise mai sus, probele introduse în eprubete cu dop de vată se tratează mai întîi cu eter, adăugat în proporție de 20%. Probele astfel tratate se amestecă intermitent timp de 2—3 ore la temperatura camerei, după care se mențin la +4°C pînă la evaporarea eterului.

În continuare se efectuează controlul bacteriologic al sterilității probelor prin însămînțare în medii lichide pentru bacterii aerobe și anaerobe, iar probele rămase nesterilizate prin tratare cu eter se filtrează printr-un filtru celulozic de tip Millipore cu porozitate de 0,45 μm, după care se face un nou control al sterilității. Cînd probele continuă să fie contaminate cu bacterii, se adaugă o soluție de antibiotice, pentru a se obține în final concentrația de 250 μg penicilină și 250 μg streptomicină și 10 μg stamicină în 1 ml de concentrat viral.

Probele astfel prelucrate se păstrează la congelator la temperaturi între —15—20°C pînă la inoculare.

Pentru reducerea efectului citotoxic al concentratelor virale se poate aplica diluarea concentratului, centrifugarea care poate elimina unele din materialele toxice în suspensie, extracția cu cloroform sau spălarea monostratului celular cu soluție salină fiziologică conținînd ser de vițel, după ce s-a produs adsorbția virusurilor pe celule.

### 3.6.9.4. Izolarea virusurilor din probe și identificarea lor

Cercetarea prezenței virusurilor în probele prelucrate se face prin inoculare la șoareci nou-născuți și pe culturi celulare.

*Inocularea la șoareci nou-născuți* evidențiază prezența virusurilor Coxsackie grupa A și B, care produc paralizii de tip flasc (grupa A) sau spastic (grupa B) urmate de moartea animalului.

Se aleg cuiburi cu 8—10 șoareci în vîrstă de 24—48 ore care se inoculează cu proba de cercetat în doze de 0,03 ml/șoarece, administrate pe cale subcutanată în regiunea interscapulară. Șoarecii inoculați sînt controlați zilnic timp de 14 zile, urmărindu-se apariția paraliziilor sau moartea animalelor inoculate. Pentru confirmarea prezenței virusurilor, de la șoarecii paralizați sau morți se fac pasagii la alte cuiburi de șoareci, care vor prezenta aceeași simptomatologie. Din cuiburile în care nu au apă-



Scanned with OKEN Scanner

rut semne de îmbolnăvire, se fac în continuare încă 2 pasagii oarbe succesive, înainte de a da un rezultat negativ.

*Inocularea pe culturi celulare* evidențiază prezența enterovirusurilor (virusuri poliomielitice, virusuri Echo, virusuri Coxsackie grup B), adenovirusurilor și reovirusurilor.

Se utilizează tuburi cu culturi celulare monostrat din linii celulare stabilizate de tip Hep., HeLa sau rinichi de maimuță. Fiecare probă se inoculează pe cîte 5 tuburi în doza de cîte 0,2 ml/tub. Tuburile inoculate se mențin la temperatura camerei timp de 1 oră pentru adsorbția virusurilor, după care în fiecare tub se adaugă 1,8 ml din mediul de întreținere celulare (mediul IC 65 cu 2% ser de vițel și cu adaos de antibiotice).

Tuburile inoculate se mențin la temperatura de 37°C timp de 6 zile, interval în care se urmărește zilnic la microscop apariția efectului citopatogen și de tip enteroviral : după 48 ore celulele se rotunjesc, pierd luminozitatea, încep să granuleze, se picnozează, formează insule și ulterior se desprind de pe peretele tubului. În ultimul stadiu, din cultură rămîn numai resturi celulare.

Pentru confirmarea prezenței virusurilor din tuburile inoculate se face încă 3 pasagii succesive. Dacă efectul citopatogen se menține și la pasaj, probele sînt considerate pozitive. Dispariția efectului citopatogen la pasagiile următoare indică un efect citotoxic.

*Identificarea virusurilor* izolate prin inoculare la șoarecii nou-născuți sau pe culturi celulare se face prin reacția de seroneutralizare cu seruri specifice de tip.

## Bibliografie


1. ALEXANDER M. — Introduction to Soil Microbiology, John Wiley and Sons Inc., New-York, 1967.
2. ALEXANDER M. — Microbiology-Ecology, John Wiley and Sons Inc., New-York-Sidney-Toronto, 1971.
3. ARTYKOV M. S. — Ghigh. i Sanit., 1973, 38, 4, 110.
4. BABOV D. M., GUBENCO L. T., MUROMȚEVA A. A., JAROȚKAIA N. E. — Ghigh. i Sanit., 1971, 3, 54—57.
5. BAGDASARIAN G. A. — Ghigh. i Sanit., 1964, 11, 37—39.
6. BAGDASARIAN G. A. — J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 1964, 8, 497.
7. BEAGER P. C. — La lutte contre les helmints transmis par le sol, O.M.S., Geneva, 1961.
8. BERG G., BERMAN D. — Appl. Environ. Microbiol., 1980, 39, 361—368.
9. BERG G., BERMAN D., STAFFERMAN R. S. — Can. J. Microbiol. 1982, 28, 5, 553—556.
10. BERMAN D., BERG G., SAFFERMAN R. S. — J. Virol. Methods, 1981, 3, 283—291.
11. BIAGI FRANCESCO F. — WHO/helminth nr. 41, 1983.
12. BITTON G., PANCORBO O. C., FARRAH S. R. — Appl. Environ. Microbiol. 1984, 47, 905.
13. BOERU V., CAJAL N., CONSTANTINESCU S. și colab. — Microbiologia și parazitologia, Edit. Medicală, București, 1966.
14. BURGES A. — Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 3.
15. BÎLBÎE V., POZSGI N. — Bacteriologie medicală, Edit. Medicală, București, 1984.
16. CONSTANTINESCU O. — Metode și tehnici în micologie, Edit. Ceres, 1974.
17. DABUROV K. K. — Ghighiena i sanitaria, 1979, 9, 27.
18. DIMITRIEVA R. A., DOSKINA T. V. — Ghigh. i Sanit., 1980, 5, 40—41.




Scanned with OKEN Scanner

# 4. Microbiologia alimentelor

## 4.1. ROLUL ȘI SEMNIFICAȚIA MICROORGANISMELOR ÎN ALIMENTE

Toate microorganismele ca bacteriile, mucegaiurile și drojdiile sînt ubicuitare, diseminate universal în mediul înconjurător, prezente în cadrul general al reciclării continue a elementelor substanței vii. Din sol și din apă, aceste microorganisme își croiesc drum spre plante, în aer, praf, tractul intestinal al omului și animalelor și înapoi spre sol și apă unde ciclul continuă. Fiecare gen pare să ocupe o nișă mai mult sau mai puțin specifică în natură, și cunoașterea acestui fapt va permite să prevedem prezența acestor microorganisme și în alimente.

Din punct de vedere practic și relativ simplist am putea clasifica microorganismele din alimente în două categorii : microfloră saprofită și microfloră patogenă.

### 4.1.1. Microflora saprofită

Flora saprofită este alcătuită din toate microorganismele pe care alimentul le întîlnește în circuitul său, de la obținere pînă la consumator și care nu generează îmbolnăvire. Acești germeni, deși de proveniență întîmplătoare, sînt mai mult sau mai puțin caracteristici pentru fiecare grup de alimente, pentru că un anumit grup de alimente întîlnește de obicei pe circuitul său condiții aproximativ asemănătoare.

Existența acestor microorganisme în număr prea mare este un indicator al unor condiții de igienă necorespunzătoare și poate influența negativ sănătatea consumatorului prin produșii de degradare enzimatică pe care îi realizează.

Microflora saprofită foarte variată care populează alimentele *poate provoca degradări* și *alterări* care antrenează modificări importante fizico-chimice și nutritive ale produselor și care provoacă frecvent mari pagube economice. În plus, prin acțiunea lor asupra substratului alimentar, microorganismele obișnuit nepatogene ajunse în condiții ecologice adecvate oferite de alimente, pot genera descompunerea acestora prin proteoliză, lipoliză și glucoliză, iar produșii respectivi de putrefacție, rîncezire și fermentație parițal cunoscuți în trecut sub termenul de ptomaine, nu numai că modifică prin această alterare proprietățile organoleptice, dar creează serioase riscuri pentru sănătatea consumatorului.



Scanned with OKEN Scanner

Flora saprofită, care se face vinovată de deteriorări organoleptice, de alterarea produselor alimentare, este foarte variată, aparținînd diverselor genuri bacteriene, precum și unele drojdii și mucegaiuri. Dintre aceste genuri mai frecvent incriminate în alterarea alimentelor apar : genul Streptococcus, Lactobacillus, Achromobacter, Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Bacillus, Clostridium, Acetobacter etc. (înșirate în ordinea frecvenței implicării în modificările organoleptice) ; sau unii fungi din genurile : Penicillium, Cladosporium, Mucor, Rhizopus, Torulla, Oidium, Sacharomyces etc.

### 4.1.2. Microflora patogenă

Riscul ca alimentele să vehiculeze noxe chimice era cunoscut cu mult înaintea secolului nostru, iar prezența bacteriilor dăunătoare a fost dovedită de perioada marilor descoperiri din epoca Pasteur-Koch și confirmată de numeroase anchete epidemiologice.

Alimentele, prin microorganismele patogene pe care le pot vehicula, sau prin metaboliții lor toxici, pot constitui cauze de îmbolnăvire. Deși îmbolnăvirile provocate de bacteriile patogene sau condiționat patogene vehiculate în alimente sînt relativ puține, totuși prin caracterul exploziv, neajunsurile și răsunetul psihologic de care se însoțesc, constituie o problemă sanitară de prim rang.

Pe lîngă posibilitatea ca alimentul să *vehiculeze microorganisme patogene de la om la om* (Salmonella typhi și paratyphi, Vibrio cholerae, Shigellele, virusul hepatitei epidemice, virusul poliomiditei etc.), s-a demonstrat și existența unor boli comune omului și animalelor, *antropozoonozele* (tuberculoza, antraxul, bruceloza, salmonelozele, febra aftoasă, leptospiroza, tularemia etc.), precum și riscul ca unele alimente să conțină larvele unor *helminți* (taenia solium, saginata, botriocefalul, trichinella, spiralis), sau să fie contaminate cu ouăle embrionate ale altora (nematode) sau cu protozooare.

În același timp s-a observat că produsele alimentare infectate cu unele bacterii patogene și păstrate în condiții favorabile pentru proliferarea microorganismelor, pot genera *toxiinfecții alimentare*, unele chiar și prin germeni cu patogenitate redusă.

În etiologia toxiinfecțiilor alimentare sînt implicate anumite bacterii patogene și condiționat patogene, care după modul de acțiune și formele de manifestare ale maladiei, se grupează în :

— bacterii care provoacă îmbolnăviri cu caracter infecțios prin multiplicarea în organismul uman a germenilor aduși de alimente : Salmonella, Shigella, Escherichia coli (tulpini patogene), Vibrio parahaemolyticus ;

— bacterii care acționează prin exotoxine elaborate în aliment înainte de a fi ingerat : Staphylococcus, Streptococcus (specii enterotoxice), Clostridium botulinum ;

— bacterii ale căror mecanisme de participare în toxiinfecții alimentare nu este pe deplin elucidat : Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Bacillus subtilis-mezentericus, Proteus, enterococi etc. În acest caz îm-



Scanned with OKEN Scanner

bolnăvirea poate fi datorată elaborării de toxine microbiene sau mai ales datorită produșilor toxici rezultați din degradarea componenților alimentari (un exemplu fiind fosforilcolina apărută prin descompunerea lecitinelor etc.).

Revenind la riscul *vehiculării prin alimente al unor microorganisme* patogene transmise de la om la om, sau de la animal la om, vom detalia puțin unele aspecte.

În legătură cu vehicularea patogenilor prin lapte, în epidemiologia tuberculozei determinată de Mycobacterium tuberculosis tipul bovin, laptele constituie cea mai importantă cale de transmitere ; produsele lactate reprezintă calea cea mai frecventă de transmitere a brucelozei neprofesionale ; de asemenea, laptele poate vehicula Salmonelle, Staphilococi enterotoxici, coagulază-pozitiv (de la animal sau de la om) și alți patogeni.

Dintre microorganismele patogene transmise prin carne, pe prim loc se situează Salmonellele apoi mult mai rar bacilul Koch, brucelele, b. anthracis, Cl. Botulinum, leptospire etc.

Carnea și preparatele de carne, peștii unii raci, crabi, moluște etc. pot fi contaminate cu *formele infestante ale unor paraziți,* ca : Taenia solium, Trichinella spiralis, Taenia saginata, Diphylobotrium latum, Cloplasma gondii etc.

În urma cunoașterii treptate a surselor și a condițiilor care favorizează apariția riscului de contaminare microbiană și parazitară a alimentelor, s-au precizat la vremea lor și măsurile adecvate de prevenire, măsuri care au intrat în practica și legislația igienico-sanitară.

## 4.2. MICROORGANISME ÎNTÎLNITE ÎN ALIMENTE

### 4.2.1. Bacteriile din alimente

Bacteriile din alimente, ca și celelalte bacterii din mediul înconjurător sînt microorganisme unicelulare, solitare, mai rar coloniale, uneori miceliene, cu organizare celulară de tip procariot, din regnul Monera.

Au o deosebită plasticitate funcțională și o intensă activitate enzimatică. Tipul de nutriție predominant este absorbția (asimilarea), însă multe grupe de bacterii sînt chemosintetice, mult mai rar fotosintetice, respectiv autotrofe sau heterotrofe. Sînt saprofite, parazite sau patogene. Se reproduc asexuat prin sciziparitate, ceea ce a dus în determinatrorul Bergeyian la poziționarea lor în clasa a II-a Schizomycetes. Sînt ubicuitare.

Bacteriile mai frecvent întîlnite în produsele alimentare aparțin la trei ordine (Pseudomonadales, Eubacteriales, Actinomycetales), aproximativ 14 familii și la peste 50 genuri bacteriene. Fiecare gen are funcțiile sale particulare de nutriție și procese degradative consecutive. Cuprind relativ numeroase specii, varietăți, tulpini și forme, ce sînt euribionete, capabile de dezvoltare și multiplicare în condiții ecologice, atît de diferite din alimente și mai ales sînt euriterme.

În tabelul nr. XXVII prezentăm o clasificare a bacteriilor din alimente.



Scanned with OKEN Scanner

## Bacterii din alimente
(după F. Jantea)

| Ordin : subordin Familie. trib gen. (specii)** | Tip morfologic | Reacție gram. | Metabolism | | | | Observații | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $O_2$ (Aer) | Oxidază | Glucoză | | Ecotip* | Habitat, surse | Alimente | |
| | | | | | A | O—F | | | Contaminat | Modificări |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| **Ordin : I.** Pseudomonadales (2) | | | | | | | | | | |
| IV. Pseudomonaceae (12) : | | | | | | | | | | |
| 1. Pseudomonas (149) | B | — | a | + /— | + /— | O | Psb, Hlb | Sol, apă, plante | Lactate, carne, ouă, legume, cereale etc. | Proteo-lipo-glicoliză |
| 2. Xanthomonas (60) | B | — | a | — /+ | + /— | O | Psb, Hlb | Plante cu necroze, sol, apă | Suc fructe, legume | Proteo-lipo-pectoliză<br>Pigment, mizgă |
| 3. Acetobacter (7) | B | — | a | + | + | O | Psb | Oțet, must de fructe, de bere<br>Murături | Suc fructe, bere, murături | Acrire |
| 4. Aeromonas (4) | B | — | a/Fa | + | + | F | Psb | Apă, mîl, canal | Pește, broaște, ouă lactate | Proteoliză, „alterare neagră" |
| 5. Photobacterium (4) | Bpl | — | a/Fa | | + | F | Psb, Hlb | Apă marină, pești marini, piele | Pește marin, carne, mațe sărate | Luminiscență, mizgă, proteoliză |
| 7. Zymomonas (2) | B | — | an/ma | | + | F | | Fructe, legume alterate | Suc fructe, bere | Fermentație, „boala cidrului" |
| 12. Halobacterium (5) | Bpl | — | | + /— | — /+ | O | Hlb | Apă marină, pește marin, sare | Pește marin sărat, saramuri | Proteoliză, pigmentare |

OBS. : Cifrele romane sau arabe dinaintea numelor proprii reprezintă numărul de ordine, iar cifrele în paranteză reprezintă numărul unităților taxonomice subiacente pe care le cuprinde unitatea taxonomică respectivă în determinatorul bacteriologic (11) * în plus de ecotipul mezobiotic. ** Speciile (în total peste 430 ) sînt cuprinse, pentru fiecare gen în parte, în *Tabele secundare*.

A = Acid din glucoză
a = Aerob
an = Anaerob
B = Bacili
Bpl = Bacili pleomorfi
C = Coci
Eu = Euritermic
F = Acțiune fermentativă asupra glucozei
Fa = Facultativ anaerob
Hlb = Halobiotic
ma = Microaerofil
O = Acțiune oxidativă asupra glucozei
Ob = Osmobiotic
Psb = Psihrobiotic
Tb = Termobiotic
Tdr = Termoduric
V = Vibrioni
\+ = Pozitiv
+ /— = Variabil, de obicei pozitiv
— /+ = Variabil, de obicei negativ
— = Negativ
( ) = Reacție întîrziată sau slabă



Scanned with OKEN Scanner

continuare tabel nr. XXVII

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VII.** Spirillaceae (10) : 1. Vibrio (34) | V | — | a/an | + | + /— | F | Hlb, Psb | Apă, apă sărată, sol, intestin om, animale | Pește, carne, saramură, lactate, legume | Denitrificare |
| **Ordin : IV.** Eubacteriales (13) : | | | | | | | | | | |
| **II.** Rhizobiaceae (3) : 3. Chromobacterium (4) | B | — | a/Fa | — | + | O/F | Psb | Sol, apă | Cereale, carne, lactate, legume | Pigment, proteoliză |
| **III.** Achromobacteriaceae (5) : 1. Alcaligenes (6) | B | — | a/Fa | + | — | — /(O) | Psb | Apă, sol, intestin | Lactate | Viscozitate, mizgă, proteo-lipoliză |
| 2. Achromobacter (15) | Bpl | — | a | + /— | — /+ | O | Psb, Hlb | Apă, sol, alimente | Carne, pește lactate, ouă, saramuri, sucuri | Proteo-lipoliză |
| 3. Flavobacterium (26) | Bpl | — | a | + /— | — /+ | O | Psb, Hlb | Apă, sol, pește marin | Pește, carne, ouă, lactate, murături, bere, legume congleate | Proteo-pectinoliză, mizgă, pigment |
| **IV.** Enterobacteriaceae (10) : Enteropatogene 10. Shigella (8,31) | B | — | a/Fa | — | + | F | Eu (Sh, Sonnei) | Intestin, ape poluate | Lactate, carne, ouă | |
| 9. Salmonella (10 ; > 1 000) | B | — | a/Fa | — | + | F | Eu, Psb | Intestin, apă, sol, alimente, purtători | Idem | |
| Arizona | B | — | a/Fa | — | + | F | Eu, Psb | Intestin, apă, sol | Idem | |
| Enterobacterii gazogene (lactozo-pozitive) | | | | | | | | | | |
| 1. Escherichia (4) | B | — | a/Fa | — | + | F | Eu, Psb | Intestin, apă, sol, alimente | Lactate, carne, ouă etc. | Fermentație |

Scanned with OKEN Scanner

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Citrobacter** | B | − | a/Fa | − | + | F | Eu, Psb | Intestin | Idem | |
| | Enterobacter | B | − | a/Fa | − | + | F | Eu, Psb | Apă, sol, rezidii, intestin, alimente | Idem | Fermentarea berii (descompune diacetilul) |
| | 3. Klebsiella (3) | B | − | a/Fa | − | + | F | Eu, Psb | Tract respirator, intestin, piele, urină | Idem | |
| | Enterobacterii negazogene (în general lactozo-negative), de obicei nedecelabile cu cele gazogene | | | | | | | | | | |
| | 8. Proteus (5) | B | − | a/Fa | − | + | F | Eu, Psb | Ape poluate, sol, intestin, alimente | Idem | Proteoliză |
| | Providencia | B | − | a/Fa | − | + | F | Eu, Psb | Intestin, ape poluate, sol | Idem | |
| | 7. Serratia (5) | B | − | a/Fa | − | + | F | Hlb, Psb | Apă, sol, alimente | Pește, lactate, ouă, saramuri, făinoase | Proteo-lipoliză, înroșire |
| | 6. Erwinia (17) | B | (− /+) | a/Fa | − | + | F | Psb/ Hlb | Vegetale, sol | Legume, fructe | Înmuiere pigment, proteo-pectinoliză |
| V. | Brucellaceae (8) : | | | | | | | | | | |
| | 1. Pasteurella (9) | B | − | a/Fa | + /− | + | F | Eu | Apă, sol, intestin, leziuni rozătoare | Carne, organe etc. | |
| | 3. Brucella (3) | B | − | a/c | + /− | − | − | | Mamifere, păsări ș.a., alimente, gunoi, apă | Lactate, carne | |
| VI. | Bacteroidaceae (5) : | | | | | | | | | | |
| | 1. Bacteroides (30) | Bpl | − | an | − | + | F | Hlb | Intestin | Pește, carne etc. | Proteoliză |
| VIII. | Micrococcaceae (6) : | | | | | | | | | | |
| | 1. Micrococcus (16) | C | + | a | − | + /− | O/−F | Psb, Hlb | Sol, apă, lactate, pește marin | Lactate, carne, pește saramuri | Pigment proteoliză |
| | 2. Staphylococcus (2) | C | + | Fa/an | − | + | | Eu, Hlb | Leziuni, purtători | Idem | |
| | 4. Sarcina (10) | C | + /(−) | a/an | − | + /− | O/F | Hlb/ Psb | Sol, apă, intestin | Pește, raci etc. | Pigment |

** Menținem această diferențiere folosită de Mossel [45b], întrucît în microbiologia alimentelor este semnificativă și convenabilă pentru practica curentă de izolare prin teste de colimetrie, deși genul citrobacter este unic și cuprinde trei grupe, respectiv freundii, Bethesda, Ballerup.

Scanned with OKEN Scanner

continuare tabel nr. XXVII

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **IX.** Brevibacteriaceae (2): | | | | | | | | | | |
| 1. Brevibacterium (23) | B | + | a/Fa | | −/+ | | Psb, Hlb | Lactate, pește, legume, sol, intestin, vite | Brînză, pește, lapte | Pigment, proteo-lipoliză |
| 2. Kurthia (3) | B | + | a/Fa | − | − | − | | Intestin, găină, om, gunoi | Păsări etc. | |
| **X.** Lactobacillaceae (2): Trib. I. Streptococceae (5): | | | | | | | | | | |
| 2. Streptococcus (19) | C | + | a/Fa | − | + | F | Psb, Hlb | Leziuni, purtători, intestin | Lactate, carne, creme etc. | Înverzire, acrire |
| Aerococcus | C | + | a | − | + | F | | Faringe, aer, piele | Carne, lactate etc. | |
| 3. Pediococcus (2) | C | + | a/ma | − | + | F | Psb, Hlb | Bere, murături, suc fructe | Bere, murături, salam, suc fructe, saramuri | Tulburare bere, suc, maturare salam |
| 4. Leuconostoc (3) | C | + | Fa/ma | − | + | F | Psb, Ob, Hlb | Zaharoase, lactate, suc, vegetale | Zaharoase, lactate, suc, vegetale, saramuri, vinuri | Carne, mîzgă, gaz, acrire |
| Trib. II. Lactobacilleae (5): | | | | | | | | | | |
| 1. Lactobacillus (15) | B | + | Fa/ma | − | + | F | Psb, Tb | Vegetale, fermentate, lactate, intestin | Lactate, murături, mezeluri, maturate | Acrire, înverzire (carne) |
| Bifidibacterium | Bpl | + | an | − | + | F | | Intestin | Lactate, carne | |
| **XI.** Propionibacteriaceae (3): | | | | | | | | | | |
| 11. Propionibacterium (11) | Bpl | + | Fa/an | | + | F | | Brînzeturi | Brînzeturi, maturate | Pigment |
| **XII.** Corynebacteriaceae (6): | | | | | | | | | | |
| 1. Corynebacterium (33) | Bpl | +/− | a/an | − | +/− | F/− | Psb, Hlb | Mucoase, intestin, sol, leziuni, plante | Lactate, carne, legume, saramuri, conserve | Pigment, lipoliză, gaz |
| 4. Microbacterium (2) | B | + | a | | + | | Tdr | Lactate | Lactate | Pigment |
| 5. Cellulomonas (10) | Bpl | +/− | a/Fa | | + | | | Sol, praf, plante descompuse | Legume, fructe | Înmuiere, celuloliză |

Scanned with OKEN Scanner

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| XIII. Bacillaceae (2) : 1. Bacillus (25) | B | +/(−) | a/an | +/− | +/− | F/O | Tb | Sol, apă, intestin | Carne, lactate, conserve etc. Pigment, proteo-lipoliză |
| 2. Clostridium (93) | B | +/(−) | ma/an | − | +/− | F/− | Tb | Sol, apă, intestin | Carne, conserve etc. Proteo-, lipoliză, gaz |
| **Ordin : V. Actinomycetales (4) :** | | | | | | | | | |
| I. Mycobacteriaceae (2) : 1. Mycobacterium (14) | B | + | A/Fa | − | + | O | Psb, Tb Hlb | Leziuni | Carne, lactate etc. |

Acțiunea pe substratul alimentar și patogenitatea sînt coordonatele cele mai însemnate ce definesc importanța bacteriilor din alimente pentru economie și pentru sănătatea publică.

### 4.2.2. Virusuri transmise prin alimente

Rolul precis pe care îl joacă alimentele în transmiterea virusurilor la om este relativ puțin studiat în prezent. Lipsa unor informații mai numeroase privind rolul alimentelor în transmiterea virusurilor este datorită în mare parte faptului că izolarea și cultivarea virusurilor din alimente este mult mai dificilă și mai de durată decît pentru bacterii.

Deși sînt foarte puține date privind incidența în alimente a unor astfel de microorganisme patogene la om, totuși problema se remarcă concomitent cu dezvoltarea modernă a tehnologiei alimentare : (a) utilizarea largă a refrigerării și congelării alimentelor pentru păstrarea produselor alimentare perisabile netratate termic, riscă să conserve virusurile odată cu oprirea sau suprimarea dezvoltării majorității microorganismelor patogene ; (b) centralizarea producției și lărgirea distribuției alimentelor, poate permite vehicularea virusurilor dintr-o zonă în care sînt endemice însă relativ inofensive, în zone unde devin exotice și ca urmare foarte patogene ; (c) tendința de a produce preparate de „bufet rece" și semipreparate culinare, care nu se mai tratează termic sau se tratează insuficient înainte de consum, și importanța manipulării neigienice în contaminarea alimentelor cu virusuri ; (d) posibilitatea poluării de origine fecală a alimentelor ; se poate presupune că virusurile sînt atît de comune în alimente ca și bacteriile intestinale.

Caracteristici principale ale virusurilor animalelor : dimensiuni cca 12 mμ—300 mμ ; genomul viral din ARN sau din ADN și capside proteice formează nucleocapsida ; peplosul proteic sau lipidic ce asigură infectivitatea (numai în celule gazdă vii) ; selectivitate de specie și țesut gazdă ; diversitate simptomatică chiar la aceeași tulpină virală ; diferențierea între virusuri bazată pe serologie.



Scanned with OKEN Scanner

### 4.2.2.1. Unele grupe de virusuri animale, care pot fi transmise și prin alimente

— Enterovirusuri (subgrup din picornavirusuri), poliovirusurile, virusurile Coxsachie A și B, virusurile ECHO, virusul heaptitei epidemice ;

— Myxovirusuri : virusul gripal cu tipurile sale produce infecții la om, cal, păsări, porc ; alți reprezentanți sînt virusurile parotiditei epidemice, rujeolei, virusul bolii de Newcastle a păsărilor, virusurile paragripale, virusul pestei porcine etc.

— Adenovirusuri diferite : a vitelor, porcinelor, păsărilor, inclusiv a omului ;

— Papovavirusuri — rol oncogen posibil ;

— Alte grupe de virusuri.

Din punct de vedere epidemiologic *contaminarea* poate fi primară (de la animale infectate, prin țesuturi, secreții și materii fecale) sau secundară prin manipularea neigienică a alimentelor. Poarta de intrare depinde de stabilitatea virusului și de tropismul lui tisular (mucoasa bucală și diseminarea respiratorie chiar prin aerosoli alimentari ; intestin dacă nu e distrus de sucurile digestive).

În carnea provenită de la animale infectate, rezistența virusurilor este variabilă în funcție de coborîrea de pH în timpul rigidității cadaverice musculare și de protecția oferită de țesuturile limfoide. Se citează supraviețuirea virusului Newcastle la păsările congelate timp de 6 luni. Myxovirusurile în laptele de vacă infectate experimental persistă 10—14 zile, atingînd peste $10^6$—$10^8$ unități infecțioase pe ml, iar în laptele de capre (infectate experimental cu virusul encefalitei de căpușă s-a transmis prin lapte de capră și vacă incorect pasteurizat într-o izbucnire cu 600 cazuri umane în Cehoslovacia în 1951.

Poluarea de origine fecală a legumelor din soluri irigate sau îngrășate cu ape reziduale fecaloid-menajere și a peștilor, broaștelor și moluștelor din ape astfel contaminate, privește în special virusul hepatitei epidemice și alte enterovirusuri (găsite în stridii recoltate la 7 km de la deversarea în mare a unui canal).

Contaminarea secundară prin manipulare este cea mai importantă (de la bolnavi — cazuri simptomatice și asimtimatice ; în incubație ; convalescenți ; vaccinați recent), mai ales de origine fecală. Adenovirusurile ating în fecale $10^6$ unități infecțioase/gram. Poliovirusurile se elimină în fecale în medie 5 săptămîni la bolnavi și la vaccinați per os neimuni, iar la 10% dintre ei chiar timp de 8 săptămîni.

### 4.2.2.2. Virusurile direct patogene la om, vehiculate de alimente

În ciuda faptului că cunoștințele noastre privind virusurile (referitor la legătura lor cu alimentele) nu le egalează pe cele privind bacteriile alimentare, se știe de cîtva timp că alimentele servesc ca vehicul frecvent pentru cel puțin două boli virotice la om : poliomielita și hepatita epidemică.



Scanned with OKEN Scanner

Zece izbucniri de poliomielită de origine alimentară care s-au petrecut între 1914 și 1949 au fost cercetate și rezumate de Cliver (1967). Din aceste izbucniri (care au interesat aproximativ 160 persoane), vehiculul alimentar pare să fi fost de 8 ori laptele, o dată limonada și o dată produse de patiserie cu cremă. Virusurile poliomielitei sînt distruse prin pasteurizarea laptelui și apariția acestor virusuri în laptele pasteurizat poate să indice o pasteurizare insuficientă, fie contaminare după pasteurizare. Este descrisă și la noi în țară epidemia de poliomielită din Dudești—Cioplea din 1949—1950 prin lapte.

Au fost citate cazuri de transmitere a virusului poliomielitei și prin moluște. Capacitatea stridiilor de a capta și reține virusul poliomielitei a fost demonstrată de Hedstrom și Lyche (1964). Acești autori arată că virusul este mai stabil în țesuturile stridiei decît în apa marină înconjurătoare. În timp ce stridiile se curăță în mod normal de bacterii în 5 ore atunci cînd sînt transferate în apă proaspătă necontaminată, virusul poliomielitic rămîne încă prezent în țesuturile stridiei.

Boala virotică care a fost cel mai mult studiată în ceea ce privește transmiterea alimentară a fost hepatita infecțioasă. Examinînd rapoarte ce acoperă o perioadă de 20 de ani, Cliver a observat peste 3 000 de cazuri de hepatită infecțioasă alimentară implicînd o varietate de alimente și condiții. Atunci cînd nu erau implicate moluștele, alimentele vehiculate erau reprezentate de lapte nefiert, salată de cartofi, sandviciuri, maioneză, bucăți de carne rece etc. În majoritatea cazurilor sursa de virusuri era un mînuitor al alimentelor care fie avusese hepatită la acea dată, fie se însănătoșise recent. În cazul hepatitei cauzate de moluște, victimele au arătat că au consumat moluște crude. Aceste animale contractează virusul din apele poluate din vecinătateaa țărmului. O asemenea invazie interesînd stridiile a fost raportată de către Mason și McLean (1962).

Alături de virusul hepatitei, Metcald și Stiles (1965) au izolat un virus Coxsackie și un virus ECHO din stridii culese din apele estuarului. Aceste virusuri au putut fi izolate din stridii găsite la distanțe de pînă la 7 km de la cea mai apropiată gură de canalizare. Acești autori demonstrează de asemenea supraviețuirea virusurilor în țesuturile stridiilor ținute la 5°C cel puțin 28 de zile.

### 4.2.2.3. Virusuri în general nepatogene la om, transmise prin alimente

Prin alimente se pot transmite și virusuri nepatogene sau rar patogene pentru om. Virusul febrei aftoase, localizîndu-se la gură, picioare și glandă mamară, boala se răspîndește foarte ușor, așa că în caz de epizootie se îmbolnăvesc aproape toate animalele (importanța economică, creează dificultăți producției și comerțului). Febra aftoasă se întîlnește la vite, oi, capre, cu mortalitate crescută la animale tinere; duce la scăderea producției de lapte și carne. Tratamente ca refrigerarea și congelarea nu sînt eficiente pentru distrugerea virusului, singurul eficient este tratamentul termic peste 70°C. Deși transmiterea acestei boli la om



Scanned with OKEN Scanner

este rară, întîlnindu-se aproape numai la copii, totuși în perioada epizootiilor de febră aftoasă, laptele trebuie fiert sau pasteurizat obligatoriu.

Virusul pestei porcine (mysovirus asemănător entigenic agentului pojarului la om) infectează deseori și oile, vitele. Poate fi transmis prin carne infectată.

Alte virusuri : virusul holerei porcilor, adenovirusurile vitelor, porcinelor și păsărilor, myxovirusurile bolii Newcastle.

Virusuri oncogene de la diferite specii animale, evoluează cu simptome de boli infecțioase la animale și este „nebiologic" să nu li se considere semnificația și pentru sănătatea omului (virusul leucozei aviare, virusul limfosarcomei bovine etc.).

Virusurile fitopatogene ale unor legume și fructe, pot fi menționate prin analogie cu virusurile animale în general nepatogene la om, de exemplu : solanium virus la tomate, cartofi ; phaseoli virus la fasole și mazăre ; cucumis virus la tomate, ardei, castraveți, vitis virus la vița de vie ; brassica virus la varză, conopidă, gulii, frunus virus la prune, piersici etc.

### 4.2.2.4. **Stabilitatea virusurilor în alimente**

Variază de la virusuri foarte labile ce contaminează produsele imediat înainte de consumare, pînă la virusuri foarte stabile, de exemplu, virusul holerei porcine, ce rămîne activ de-a lungul întregului proces tehnologic, avînd în plus și un mare potențial epizootic.

Viabilitatea virusurilor în alimente depinde în primul rînd de factorul temperatură. Căldura inactivează proteinele din capsa virotică și acizii nucleici. Frigul (refrigerarea, congelarea) inactivează mai puțin virusurile, uneori chiar le conservă. Astfel, unele adenovirusuri rezistă 30 zile la 4°C. S-a demonstrat supraviețuirea virusurilor enterice (virusul hepatitei epidemice, virusul Coxsakie și ECHO) în țesuturile stridiilor ținute la 5°C cel puțin 28 zile.

Alți factori care influențează viabilitatea virusurilor sînt : compoziția chimică a alimentelor, pH-ul, agenții oxidanți, radiații, uscarea etc. Astfel, dăm un singur exemplu de virus cu o mare stabilitate în alimente, virusul bolii Newcastle care rezistă luni și ani în secreții și țesuturi disecate provenite de la păsări bolnave.

Revenind la problema virusurilor patogene pentru om transmise prin alimente, ca o concluzie putem afirma că incidența reală a infecțiilor virale alimentare poate fi considerabil mai mare decît datele indicate acum. Virusurile enterice descrise anterior sînt eliminate din corp prin fecale în același mod ca și Coliformii, Cl. perfringens, Salmorellele etc. Deși multe nu pot în aparență să supraviețuiască timp îndelungat în condiții de mediu adverse, altele găsesc condiții de supraviețuire. Originea lor în alimente poate fi probabil aceeași ca și pentru bacteriile intestinale.



Scanned with OKEN Scanner

## 2.2.3. Fungii : drojdiile și mucegaiurile

Fungii sînt vegetale inferioare criptogame, lipsite de clorofilă, aparțin încrengăturii Thallophyta, se hrănesc heterotrof și se înmulțesc prin spori sexuați și asexuați.

Fungii cuprind levurile (drojdiile) și mucegaiurile.

### 4.2.3.1. Levurile sau drojdiile

Reprezintă un grup taxonomic heterogen de microorganisme din filumul Eumycetes (fung adevărați) care se prezintă dominant în formă unicelulară și au o organizare internă de tip eucariot (nucleu adevărat cu membrană nucleară, prezența mitocondriilor și a reticulului endoplasmic etc.). Se înmulțesc obișnuit prin înmugurire, ocazional prin procese sexuale (asce cu ascospori). O caracteristică biochimică principală este capacitatea lor de a produce fermentația caracteristică a mediilor ce conțin hidrocarbonate (termenul de levuri de la lat. levere = a ridica, fr. levain = aluat dospit). Mayena le-a numit „ciuperci de zahăr" (Saccharomyces).

*Morfologie :* au în mod obișnuit o formă sferică, ovală sau alungită uneori filamentoase (structură pseudomiceliană la Candida, Endomyces etc.). Mărimea medie a drojdiilor este 4—8 μ × 7—12μ. Formele pseudomiceliene ating dimensiuni 70 μ × 8—12 μ.

*Metabolism :* levurile folosesc ca sursă de carbon diferite zaharuri acizi organici, glicerol, iar ca sursă de azot produse rezultate din hidroliza proteinelor (peptone, aminoacizi, amoniac, uree etc.) ; pH optim este 4,5—5,0. În anaerobioză levurile realizează fermentația alcoolică a zaharurilor cu producere de $CO_2$ și alcool etilic.

*Reproducerea :* levurile se pot reproduce pe două căi : a) cale asexuată, prin înmugurire sau diviziune directă (reproducerea asexuată este întîlnită în toate drojdiile) ; b) reproducerea sexuată, proprie drojdiilor din speciile sporogene, cu formarea unui zigot, care se poate transforma într-o ască cu *ascospori* în interior. Ascosporul este tipul cel mai caracteristic de spori la drojdii. Unui alt tip de spori îi aparțin *balistosporii* care apar pe cale asexuată.

*Răspîndirea în natură și importanță :* Levurile sînt foarte larg răspîndite în natură, locurile lor de acumulare maximă fiind legate de prezența hidrocarbonatelor, de obicei de natură vegetală. Drojdiile sînt larg folosite în practică pentru obținerea unor produse prin activitatea lor fermentativă (în industria spirtului, vinificației, panificației, industria berii), pentru producția de masă celulară (drojdii furajere, drojdie de bere) și pentru extragerea din culturile lor a unor vitamine din grupul B ($B_1$ și $B_2$) și a provitaminei D (ergosterol).

Drojdiile (levurile) mai frecvent întîlnite în și pe alimente aparțin genurilor : Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Torulopsis (Torula),



Scanned with OKEN Scanner

Rhodotorula, Hansenula și Mycoderma, Schizosaccharmyces, Debaromyces, Brettanomyces, Candida. În plus de aceste genuri de drojdii, există multe alte genuri ce pot fi întîlnite în alimente.

Drojdiile nu sînt patogene dacă sînt absorbite pe cale digestivă. Printre genurile citate am semnalat chiar unele drojdii foarte utile în tehnologia alimentară. Pe de altă parte, după cum am arătat anterior, multe dintre drojdii sînt răspunzătoare de alterarea unor importante produse alimentare.

Prezența fungilor în număr mare într-un aliment informează despre antecedentele improprii de igienă ale produselor și permite aprecieri privind consumabilitatea lor ; numărul de drojdii și mucegaiuri este considerat printre indicatorii sanitari microbiologici ai alimentelor.

### 4.2.3.2. Mucegaiurile

Mucegaiurile sînt fungi filamentoși care se reproduc prin spori asexuați și sexuați. Ca toate ciupercile, mucegaiurile sînt plante fără clorofilă cu structură celulară de tip eucariot. Sînt răspîndite pretutindeni în natură : în apă, sol, ca saprofiți, pe substanțe organice în descompunere și ca paraziți la plante și animale. Au o capacitate foarte mare de (adaptare la condiții variate, nefavorabile pentru alte microorganisme (aciditate, presiune osmotică mare, uscăciune etc.).

Corpul lor este constituit dintr-un *tal* (masă vegetală neregulată) și se formează prin creșterea împreună a numeroase filamente lungi și subțiri numite *hife*, dar al căror ansamblu reprezintă un miceliu.

Dezvoltarea mucegaiurilor se caracterizează prin două faze : a) faza negativă, reprezentată în majoritatea cazurilor dintr-un sistem hifal sau micelian ; b) faza reproducătoare, caracterizată prin formarea unor elemente de reproducere asexuată sau sexuată, adesea cu un înalt grad de diferențiere și variind ca dimensiuni de la microscopic la macroscopic și ca durabilitate de la efemer la peren.

Hifele care alcătuiesc miceliile constau fie din celule alungite alipite cap la cap (miceliu septat), fie dintr-o celulă unică, mult alungită și ramificată (miceliu coenocitic). Organizarea coenocitică a miceliului este tipică la Phycomycetes (exemple : genurile Mucor, Rhizopus etc.). Organizarea septată a hifelor este caracteristică mucegaiurilor din clasele Ascomycetes, Basidomycetes și Fungi imperfecți.

Reproducerea poate avea loc prin spori asexuați și spori sexuați. Sporii sexuați apar în stadiul denumit „perfect" al fungilor, prin fuziunea a doi gameți, exemple de spori sexuați : ascosporii, bazidiosporii, zigosporii. Sporii asexuați, categoria de spori cea mai frecvent observată la mucegaiuri, se formează în număr mare, servesc la dispersarea speciei în natură fiind ușor antrenați de vînt, sînt în general colorați și, ca atare, dau miceliilor bătrîne în zona centrală a colo-



Scanned with OKEN Scanner

niei o culoare caracteristică ; sporii asexuați sînt reprezentați prin cîteva tipuri caracteristice și pot servi la diferențierea genurilor și speciilor.

Contaminarea cu mucegaiuri a alimenelor poate determina modificări ale celor trei aspecte principale ce privesc calitatea unui produs — salubru, nutritiv, plăcut — fenomene ce prezintă în același timp, implicații igienico-sanitare .

Modificarea proprietăților organoleptice, alterarea, se traduce prin miros particular, modificări de culoare și gust, și mari dificultăți în păstrarea, conservarea alimentelor contaminate cu mucegaiuri. Mucegaiurile pot afecta și valoarea nutritivă prin modificări ale conținutului aminoacizilor la unele alimente mucegăite, bogate în proteine, ducînd la degradarea valorii nutritive ; de asemenea, alimentele ce conțin grăsimi suferă o lipoliză sub acțiunea unor mucegaiuri lipolitice ca, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Penicillium stekii etc., responsabile de rîncezire prin hidroliză și oxidare.

Cel mai important apare *riscul de îmbolnăvire* asupra consumatorilor. S-a demonstrat apariția *diverselor micotoxine* în produsele alimentare, numeroase cercetări au pus în evidență variatele lor efecte nocive : cancerigene, hepatotoxice, nefrotoxice, teratogene, anemiante, leucopneizante, acțiune hiperestrogenică, toxice nervoase, acțiune alergizantă etc. Semnalul de alarmă a fost lansat și de descoperirea frecventă a unor noi micotoxine. Referindu-ne numai la aflatoxine, astăzi după două decenii de la descoperirea lor se cunosc *17 aflatoxine* produse nu numai de Aspergillus flavus, dar și de multe alte specii din genul Aspergillus, unele specii din genul Penicillium și Rhizopus ($B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$, $G_1$, $G_2$, $M_1$, $M_2$, $GM_1$, $Gm_2$, $P_1$, $P_2$, $Q_1$, $Q_2$, $H_1$, aflatoxicol, aspertoxină). Aflatoxinele sînt hepatotoxice, mutagene, cancerigene, teratogene. Aflatoxina $B_1$ este considerată printre cele mai cancerigene substanțe cunoscute, întrecînd efectele 3—4 benzpirenului reputat oncogen.

Acțiune cancerigenă mai au și alte micotoxine ca : *sterigmatocistina, luteoschirina, patulina* etc.

Ochratoxinele (secretate de unele specii de Aspergillus și Penicillium) sînt intens hepatotoxice, dar pot avea și efecte nefrotoxice. Citrinina, elaborată de Penicillium citrinum, este o nefrotoxină autentică.

Efecte toxice nervoase sînt descrise la diverse micotoxine : patulina, acidul cojic, citreoviridina, maltorizina etc.

Mucegaiurile din genul Fusarium secretă diverse micotoxine. Inițial, fusariogenina și poina au fost implicate în sindromul denumit „aleukia toxică alimentară" cu angină, anemie, leucopenie. În 1974, Bamberg și Strong testează un număr de aproximativ 22 produși, definiți trichotaecene (metaboliți ai mucegaiurilor din genul Fusarium, Trichotecium, Cephalosporium, Trichoderma) cu acțiuni toxice de tipul „aleukiei toxice alimentare", în plus produc hemoragii, au efect emetizant și după cercetări mai recente pot prezenta și neurotoxicitate și teratogeneză. *Zearalenonele,* micotoxine secretate de unele specii din genul Fusarium (dar și de genul Gibberela sp. zeae) au efecte intense hiperestrogenice, determinînd avort la animale.

Datorită însușirilor senzoriale neplăcute, omulcevită de obicei să consume alimente mucegăite. Totuși riscul persistă dacă astfel de produse sînt incluse în hrana animalelor, deoarece, în acest caz micotoxinele se vor găsi în lapte, carne etc.

Se pune problema ineficienței prelucrării termice asupra majorității micotoxinelor. De asemenea, se pune problema ineficienței mijloacelor de decontaminare și de detoxifiere a produselor alimentare mucegăite. De aceea se impun măsuri igienico-sanitare de prevenire a contaminării alimentelor și înlăturarea din consum a produselor necorespunzătoare, evitînd astfel apariția patologiei la consumator.

Potențialul micotoxinogen al produselor alimentare face parte din obiectivele prioritare ale unor programe naționale sau lansate de O.M.S. în ultimii ani.

De asemenea, s-a intensificat studiul proceselor mutagene, teratogene și oncogene conexe, dar mai ales interesul pentru tratamentele decontaminate și măsuri profilactice, determinînd o adevărată explozie bibliografică, cu mii de referințe. S-a stabilit o limită pentru conținutul de aflatoxine al alimentelor. În Anglia, Canada și Irlanda, această limită este de 5 micrograme/kg produs alimentar, iar în R.F.G. și S.U.A., nu se admite prezența aflatoxinelor nici în alimente și nici în furaje.

Din punct de vedere practic, examenul micologic cantitativ este foarte util, poate fi un indicator de latență a pontențialului micotoxinogen în general, și aflatoxinogen în particular, proporția tulpinilor aflatoxinogene exprimă iminența riscului în condiții microecologice favorizante ; dar indicatorii de certitudine îi constituie doar conținuturile de micotoxine existente în produs.

### 4.2.4. Paraziți transmiși prin alimente

Parazții au forme infestate de talie microscopică (rar macroscopică) și de obicei sînt transmisibile prin alimente crude, insuficient prelucrate termic, sau manipulate neigenic, generînd fie îmbolnăviri, fie numai modificări organoleptice dezagreabile.

Unii paraziți există în alimente prin infestare primară a țesuturilor animale destinate consumului (carne, pește, raci, crabi, moluște), unde își pot desfășura ciclul lor evolutiv în anumite faze, ca de exemplu, Taenia solium, Trichinella spiralis, Taenia saginata, Diphyllobothrium latum, Clonorchis sinensis, Opistorchis felineus, Paragonimus westermani, Toxoplasma gondii etc.

Alții provin din mediul ambiant (sol, praf, apă) infestat originar de animale sau om, și contaminează produsele alimentare direct sau prin manipulări neigienice, de exemplu, Ascaris lumbricoides, Oxyuris vermicularis, Himenolepis nana, Taenia echinococcus, Fasciola hepatica, Fasciola hepatica, Fasciolopsis buski, Entamoeba coli, Entamoeba dysenteriae, Giardia intestinalis, Balentidium coli, Leishmania donovani, Isospora hominis etc. În tabelul nr. XXVIII se prezintă paraziții transmiși prin alimente.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XXVIII*

**Paraziții transmiși prin alimente**

| *Specia și gazda definitivă* | *Forma din mediul exterior și gazda intermediară* | *Forma și modul de infestare (boala produsă)* |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| I. *Cestode* | A. *Helminți* | |
| *Taenia solium* (om) | Proglote — embrion hexacant<br>Porcine: (cysticercus celulosae) | Cisticerci; carne de porc mistreț sau de bovine infestate |
| *Taenia saginata* (om) | Bovidee: (cisticercus bovis) | *Teniaze intestinale.* Accidental cisticercoză la om |
| *Diphyllobotrium latum* (om, cîine, pisică, vulpe) | Ouă — embrion hexacant — larvă ciliată (apă) — crustaceu (larvă procerenoidă) — pești (larvă plerocercoidă) | Larvă plerocercoidă. Pești (știucă, somn, biban, mihalț) icre. *Teniază intestinală* |
| *Taenia echinococcus* (echinococcus granulosus) (cîine, pisică, lup) | Ouă (embrion hexacant) (pe sol, în apă) | Embrion hexacant. Crudități. *Chist hidatic* frecvent la animale de abator, accidental la om |
| *Hymenolepis nana* (om) | Proglote — ouă (embrion hexacant) | Embrion hexacant. Crudități *Teniază intestinală* |
| II. *Nematode* | | |
| *Trichinella spiralis* (om, porc, șobolan, mistreți, urși) | Larve — mucoasă intestinală — circulația generală — mușchi (larve închistate) | Larve închistate în carne de porc. *Trichinoza* |
| *Ascaris lumbricoides* (om) | Ouă — embrionate (sol, apă) | Ouă larvate. Apă, crudități. *Ascariaoză intestinală și pulmonară* |
| *Trichocephalus hominis* (om) | Ouă — embrionate (sol, apă) | Ouă larvate. Apă, crudități. *Verminoză intestinală* (apendicită) |
| *Oxiuris (Enterobius) vermicularis* (om) | Ouă embrionate (sol, apă) | Ouă embrionate (autoinfestare, praf). Alimente infestate prin praf, muște, manipulare. *Oxiuroză* |
| III. *Trematode* | | |
| *Fasciola hepatica; Dicrocelium dendriticum* (ovine, caprine, porcine, accidental: om) | Ouă — miracidium — gasteropode (melc) — (sporochiști — redii) — cercari liberi — c. închistați | Cercari închistați. Apă și crudități (creson). *Distomiaza hepatică și buco-faringiană* |
| Clonorchis sinensis (foarte frecvent în Orient); Opistorchis felineus (N. Est. Europa etc.) (om, cîine, pisică) | Idem — cercari închistați la pești | Cercari închistați. Pești infestați (lin, roșioară, văduviță, crap). *Angiocolită* (hepatită) |
| *Paragonimus Ringeri (Westermanii)* (om, cîine, pisică, porc) | Idem — cercari închistați la crustacei | Cercari închistați: raci, crabi. *Verminoză pulmonară* (hemoptizi). Localizări în *organe (creier)* |



Scanned with OKEN Scanner

Continuare *tabel nr. XXVIII*

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| *Fasciolopsis buski* (om, porc) | Ou — evoluează în moluscă (Segmentina) | Cercari închistați pe frunze, fructe, tuberculi plante — *Fascioloza intestinală* |
| | B. *Protozoare* | |
| *Infuzorii :*<br>*Balantidium coli* (porc) | Chiste, sol, apă | Apă, crudități (apă și sol), cîrnați cruzi |
| *Flagelate :*<br>*Giardia (lamblia) intestinalis* (om) | Chiste, sol, apă | Apă și crudități infestate prin sol. *Giardioză* |
| *Rizopode :*<br>*Entamoeba coli* (om)<br>*Entamoeba dysenteriae* (om) | Chiste, sol, apă | Incolinism<br>Enterocolită. Dizenterie |
| *Sporozoare (Coccidii) :*<br>*Izospora hominis* (om)<br>*Toxoplasma gondii* (om, porc, oaie, iepure, cîine, pisici șobolani) | Chiste, sol, apă | Enterocolită<br>(?) Lapte, carne de animale bolnave. *Toxoplasmoza* |

## 4.3. INTERRELAȚII ECOLOGICE ALIMENT-MICROORGANISME

Contaminarea microbiană odată realizată, evoluția inoculului spre multiplicare, rezistență sau distrugere se reduce la o problemă de specie și de timp, dacă ansamblul condițiilor întîlnite în aliment o permit.

La examenul microbiologic al alimentelor s-a constatat de multe ori că în anumite situații deteriorarea organoleptică era de fapt consecința unei contaminări inițiale minime, dar al cărei conținut de bacterii s-a mărit ulterior în timpul păstrării, diferențiat în funcție de natura particulară a produsului, generînd în final o alterare caracteristică, specifică.

De aceea considerăm alimentul ca un biotop cu configurație proprie, cu o structură caracteristică, ce poate oferi cadrul abiotic pentru instalarea spontană ori artificială și pentru funcționarea unor cenoze microbiene. Se constituie astfel o microbiocenoză sau sistem microecologic deschis, unde se desfășoară interrelațiile complexe aliment-microbi. Abordarea de pe poziții ecologice a acestora, ierarhizează factorii implicați, orientează practica curentă și cercetarea în microbiologia alimentelor.

Fiecare aliment este caracterizat printr-un grup de *parametri intrinseci* constînd din : apa disponibilă ($a_w$ — apa activă) ; pH ; potențial de oxidoreducere (Rh, Eh) ; compoziție în factori nutritivi ; substanțe antimicrobiene (fitoncide, lizozim etc.) ; o structură biologică care este în stare să preîntîmpine intrarea multor microorganisme (structură fizică, structură electrolitică). Cînd un aliment este caracterizat în această privință, se poate pronostica perisabilitatea lui, luînd în considerație ca-



Scanned with OKEN Scanner

pacitatea generală a unei anumite flore de a se dezvolta în cadrul acestor parametri.

Un factor deosebit de important al mediului interinsec din aliment este faza apoasă și îndeosebi apa activă ($a_w$), nelegată, disponibilă, care condiționează de fapt dezvoltarea, multiplicarea microorganismelor și activitatea enzimatică în alimente. Alimentele bogate în apă (70—90%) sînt perisabile, de scurtă durată, spre deosebire de alimentele desicate, uscate care au o durabilitate lungă (neperisabile).

pH-ul și capacitatea de tampon a substratului au efect selectiv asupra microflorei din alimente și s-a arătat, spre exemplu, că în conserve sporii remanenți de Clostridium botulinum și de alți anaerobi de putrefacție nu germinează la un pH de 4,5 sau mai mic. Compoziția și proprietățile legumelor și fructelor ne orientează asupra diverselor tipuri de microorganisme care duc la alterarea lor. pH-ul și potențialul redox relativ mari la unele legume le fac susceptibile de alterare bacteriană ; în timp ce pH-ul deobicei scăzut al fructelor justifică alterarea lor primară prin mucegaiuri.

Alimente ca laptele și carnea, prin compoziția în factori nutritivi (proteine, lipide, vitamine etc.), prin apa disponibilă și prin pH-ul convenabil constituie medii foarte bune pentru multiplicarea diverselor microorganisme. În alimentele crude, proaspete, intervine și potențialul redox care în această situație este coborît, asemănător cu al celulelor vii, datorită grupărilor tiolice active în țesuturile de origine animală, ori acidul ascorbic și a zaharurilor reducătoare în cele de origine vegetală.

După compoziția în factori nutritivi (proteine, lipide, glucide) a alimentelor se selectează o anumită floră microbiană, în funcție de substratul asupra căreia acționează predominant — floră *proteolitică, lipolitică, glucidolitică.* Alimentele cu o concentrație crescută de zahăr și de sare nu constituie un mediu prea prielnic pentru dezvoltarea microorganismelor. Există însă microorganisme care suportă aceste presiuni osmotice mari — microorganisme osmobiotice.

Repetăm și subliniem că în alimente se selectează o anumită floră microbiană în funcție de substratul asupra căreia acționează predominant. Astfel, de exemplu, laptele și derivatele de lapte, alimente cu un conținut mare de apă și mai ales în factori nutritivi, constituie medii prielnice dezvoltării microorganismelor nedorite. În condiții obișnuite, aceste microorganisme pot fi inhibate de concurența bacteriană și de mediul acid pe care îl creează flora de fermentație lactică spontană sau adăugată industrial. Sînt însă frecvente situații cînd, paralel cu această floră sau devansînd-o dezvoltă microorganisme nedorite, în special microorganisme cu activitate *predominant proteolitică,* vinovate de alterarea laptelui și produselor lactate, ca : bacilii nesporulați (colibacili, Pseudomonas, Achromobacter, Protesus etc.), coci (Streptococcus faecalis), bacili aerobi sporulați (genul Bacillus), sau anaerobi sporulați din genul Clostridium etc.

Dintre *factorii extrinseci* care influențează microflora din alimente prezintă importanță în special : temperatura de stocare, umiditatea relativă a mediului de depozitare, prezența sau absența gazelor ca : $CO_2$ și $O_3$, radiațiile etc.



Scanned with OKEN Scanner

Depozitarea alimentelor uscate la o umiditate relativă crescută poate compensa parametrul intrinsec $a_w$ și permite creșterea microorganismelor într-un produs de altfel stabil.

Un factor deosebit extrinsec este temperatura de stocare. În funcție de nivelul termic, la care sînt păstrate alimentele rezultă și temperaturile lor interioare.

În funcție de nivelul termic microorganismele se împart în trei categorii :

— Psihrofile (psihrobiotice), care își desfășoară procesele vitale la frig.

— Mezofile (mezobiotice), care își desfășoară procesele vitale la temperaturi medii.

— Termofile (termobiotice), care își desfășoară procesele vitale la temperaturi ridicate.

Cea mai joasă temperatură la care s-a semnalat multiplicarea bacteriilor este aproximativ —20°C, și cea mai înaltă puțin peste 90°.

*Psihrofilii* în alimente se pot dezvolta, multiplica la temperaturi cuprinse între —10°C și +40°C, cu optimumul între 10—20°C. Temperatura de +5°C (psihrostat) este selectivă pentru psihrofili. Efectele acțiuni enzimatice, manifestările ei extracelulare asupra substratului prin descompunerea proteinelor, lipidelor etc., sînt decelabile întotdeauna, dar după perioade lungi de incubare, de mai multe zile, săptămîni sau chiar luni, datorită ritmului lent de proliferare microbiană și de cinetică enzimatică la frig. În absența creșterii, la temperaturi sub —10°C se pot constata modificări biochimice ale substratului alimentar datorate acțiunii enzimatice extracelulare a microorganismelor psihrobiotice și acumulării de enzime pe seama autolizei indivizilor morți.

Tulpinile și speciile psihrofile pe care le găsim mai frecvent în alimente aparțin genurilor : Achromobacter, Alcaligenes, Pseudomonas, Flavobacterium, Streptococcus, Micrococcus, Acetobacter, Vibrio etc. Aceste microorganisme cresc bine la temperaturi de refrigerare și produc alterarea cărnii și derivatelor de carne, făinuri de carne, ouă, pește și a altor alimente normal ținute la această temperatură.

*Mezofilii* se pot dezvolta la temperaturi cuprinse între +5°C și +50°C : cu zona optimă de multiplicare între +20°C și +40°C. Temperaturi selective pentru bacteriile mezofile se folosesc +37°C și +32°C. Temperatura ideală de incubare pentru „numărul total de microorganisme“ este de +32°C pentru microbiologia alimentelor. La această temperatură se dezvoltă maximum de mezofilii (este la mijlocul zonei optime), se cuprind și o parte dintre psihrofili, precum și o parte dintre bacteriile termofile.

Speciile și tulpinile mezofile sînt cunoscute printre majoritatea genurilor bacteriene și se găsesc pe alimentele ținute la temperaturi de refrigerare sau la temperatura camerei etc.

*Termofilii* reprezintă o categorie mai restrînsă printre bacteriile din alimente. Au temperatura optimă de dezvoltare cuprinsă în zona +45°C și +60°C. Temperatura de +56°C este selectivă pentru termofili.



Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea termofililor fac parte din genul Bacillus și genul Clostridium ; și deși puține specii din aceste genuri sînt termofile, ele sînt foarte importante pentru industria conservelor.

Dacă activitatea biologică normală a microorganismelor depinde de elementele mediului intrinsec din aliment și extrinsec acestuia, prin capacitatea lor mare de adaptare ele pot însă compensa faptul că în natură, sau în mod artificial în culturi, condițiile optime de viață se întîlnesc destul de rar.

Potențialul bioecologic și valoarea ecologică a speciilor microbiene sînt, de asemenea, proprietăți ce permit caracterizarea microorganismelor din alimente, în funcție de modul cum reacționează la condițiile de mediu : *euribionte* — cele cu rezistență și toleranță largă la factorii ecologici ; *euritope* — cele ce se pot dezvolta în biotipuri diferite ; *euriece* — cele ce se pot dezvolta în cenoze microbiene variate etc.

O serie întreagă de observații practice asupra populațiilor microbiene esterogene din alimente permit considerarea presiunii de selecție ca un factor important în respectiva nișă ecologică. În condițiile existente în biotipul aliment, selecția duce la perfecționarea proceselor metabolice celulare bacteriene, de autoreglare metabolică, de înmulțire, singurele mijloace active de conservare și apărare a germenilor în aliment. Restructurarea rapidă, remarcabilă, a metabolismului, utilizarea cu eficiență sporită a resurselor din aliment, face ca în condiții adecvate, specia microbiană să aibă o prolificitate crescută, compensatoare a pierderilor individuale, competitivă. Caracterul selecției în cadrul evoluției ecosistemului depinde de toleranța microbilor la intensitatea și diversitatea factorilor de selecție ce acționează în aliment.

Pe baze ecologice microorganismele din alimente pot fi grupate fie după factorul abiotic dominant ce condiționează concentrarea, biomasa lor în : psihro-, mezo-, termo-, osmo-, halo-, aero-, anaero → biotice ; fie pe criteriul specializării funcționale majore, adică al acțiunii predominante asupra substratului din aliment, în : proteo-, lipo-, amilo-, pecto-, celulozo-, → litice, ori alcoolo-, acetico-, lactacido-, → gene etc.

De asemenea și alimentele pot fi grupate, clasificate în funcție de asemănările de structură și proprietățile fizice și chimice, umiditatea și tempratura fiind în primul rînd limitative pntru dezvoltarea microbilor.

Abordarea de pe poziții ecologice a interrelațiilor complexe aliment-microbi, ierarhizează implicația naturală sau artificială a factorilor, orientează practica curentă și cercetarea în microbiologia alimentară, și permite extrapolarea judicioasă a rezultatelor în tehnologia agrozoo-alimentară, evitînd astfel neajunsurile metodologice. De asemenea, prezintă interes pentru interpretarea dinamicii biocenozei din aliment. Posibilitățile de diferențiere pe această bază a microflorei dominante, autohtone, de cea de pasaj, are consecințe însemnate pentru microbiologia analitică și pentru măsurile de igienizare. În final, are importanță pentru îmbunătățirea și pe aceste căi a calității produselor, mergînd spre exemplu chiar pînă la utilizarea de tulpini trofinogene în cadrul florei industriale selecționate, în vederea obținerii unei valori nutritive ridicate a alimentelor.



Scanned with OKEN Scanner

## 4.3.1. Alterarea produselor alimentare : microflora dominantă în alterarea unor alimente

*Conținutul noțiunii :* În mod general prin alterarea (din latinescul alter-altul) unui aliment ar trebui înțeles orice modificare a stării lui normale inclusiv defectele. Întrucît prin analizatorii săi, omul sesizează numai modificările însușirilor senzoriale (organoleptice), practic alterarea cuprinde numai o schimbare defavorabilă a acestor însușiri, care tulbură aspectul psiho-afectiv al relației dintre om și aliment. Științific însă, trebuie avut în vedere că adeseori alterarea este însoțită sau curînd urmată de nocivizare și de reducerea sau chiar de anularea valorii nutritive a produsului respectiv, adică ea este un proces complex interesînd și celelalte aspecte ale relației om-aliment de care depinde calitatea unui produs alimentar.

Ca o definiție, relativ simplă, prin alterare înțelegem modificarea proprietăților organoleptice ale unui aliment sub acțiunea enzimelor proprii și în special prin proliferarea și activitatea enzimatică a microorganismelor ce se pot dezvolta pe și în aliment.

*Cauzele alterării :* Sînt ceva mai multe decît cele două principale enunțate în definiția anterioară, și anume :

— modificări fizice — deformări mecanice, prezența de impurități, pierderea de apă (ofilirea, uscarea) sau dimpotrivă acceptarea de apă (umectarea produselor deshidratate), cristalizarea unor soluții aproape saturate (exemplu zaharisirea), contaminarea cu substanțe odorante care modifică proprietățile organoleptice etc.

— modificări biochimice (biologice) :

- prin activitatea enzimelor proprii
- dezvoltarea elementelor de reproducere a speciei (embrionarea oului, germinarea cerealelor, încolțirea unor legume)
- prin proliferarea și activitatea enzimatică a microorganismelor care se dezvoltă pe și în aliment.

*Natura microorganismelor* (bacterii sau fungi, genuri și specii) depinde în primul rînd de compoziția produsului alimentar (de substratul asupra căruia acționează), și de condițiile în care acționează agentul : conținutul în apă și presiunea osmotică a alimentului, aciditatea (pH-ul), temperatura ambiantă (viteza reacțiilor de descompunere și alterare crescîndă aproape geometric față de nivelul termic) etc.

*Mecanismul de acțiune a microorganismelor :*

— Proteoliză — peptone (polipeptide), aminoacizi din care prin desmoliză (decarboxilare, dezaminare, desulfurare) se formează amine (putresceina, cadaverina, metilamina, trimetilamina, feniletilamina, tiramina, triptamina, histamina), oxiacizi, amoniac, hidrogen sulfurat, mercaptani, indol, scatol etc. Acestea dau produselor un miros foarte neplăcut de putrefacție, iar multe dintre ele au și efecte toxice sau iritante pentru mucoasa tubului digestiv.

— Fermentația glucidelor și a derivaților lor (alcoolică, lactică, acetică, propionică, butirică, manitică etc.) și rezultatele sale nedorite, defavorabile.



Scanned with OKEN Scanner

— Lipoliza — sau rîncezirea grăsimilor prin hidroliză și oxidare. Hidroliza enzimatică este produsă de lipaze proprii tisulare și în special de lipaze elaborate de bacterii lipolitice și de mucegaiuri, oxidarea este favorizată de oxidaze tisulare și microbiene, cu formare de peroxizi, aldehide, cetone etc. (cu efecte iritative asupra mucoasei tubului digestiv).

— Formarea de pigmenți care modifică culoarea normală a produselor alimentare, prin acțiunea microorganismelor cromogene (unele bacterii și frecvent drojdii și mucegaiuri).

**Modificările organoleptice și riscurile care însoțesc alterarea alimentelor**

În timpul alterării, prin activitatea enzimatică a microorganismelor și descompunerea substratului aliment apar modificări organoleptice : schimbarea aspectului general (formă, consistență, culoare), apariția unor mirosuri dezagreabile sau respingătoare (datorită produșilor de descompunere a proteinelor și lipidelor), modificarea gustului sau generarea unei senzații neobișnuite.

Concomitent poate avea loc formarea de substanțe dăunătoare sănătății : feniletilamină, tiramină, triptamină, histamină etc. (din descompunerea proteinelor), fosforilcolină (enterochinetică) din descompunerea lecitinelor) și apariția de alcaloizi cadaverici (ptomaine animale) cum sînt policolina, colidina etc.

Deși majoritatea bacteriilor care provoacă alterarea produselor alimentare sînt nepatogene sau numai condiționat patogene, totuși cînd proliferarea lor este intensă și produșii rezultați din metabolismul propriu acționează concomitent cu cei proveniți din descompunerea alimentelor, efectul se potențează reciproc și ele devin nocive, generînd toxiinfecții prin consum de „alimente alterate" (nespecifice).

Cînd microorganismele vinovate de alterare sînt reprezentate de mucegaiuri, produsele alimentare pot conține diferite micotoxine ale căror efecte toxice variate le-am arătat în capitolul anterior.

## 4.3.2. Microflora dominantă în alterarea cărnii, preparatelor de carne, a păsărilor și a peștelui

Carnea este cea mai perisabilă dintre alimentele mai importante. Ea conține o abundență din toate principiile nutritive necesare pentru creșterea bacteriilor, drojdiilor și mucegaiurilor.

În ce privește microflora cărnii relativ proaspete, a cărnii preparate, a păsărilor și a peștelui proaspăt, pot fi prezente, deși în cantitate mică, variate genuri de bacterii saprofite : Achromobacter, Aeromonas, Aerobacter (Enterobacter), Alcaligenes, Escherichia, Flavobacterium, Halobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Micrococcus, Pediococcus, Photobacterium, Vibrio etc.

Următoarele genuri de mucegaiuri au fost izolate din carnea și peștele relativ proaspăt : Thamnidium, Penicillium, Sporotrichum, Cladosporium, Mucor, Aspergillus, Alternaria, Oidium, Fusarium, Botrytis, Rhizopus etc. și s-au identificat următoarele genuri de drojdii : Candida, Debaromyces, Sacharomyces, Torulopsis, Rhodotorula, Torula etc.



Scanned with OKEN Scanner

Cînd este examinată carnea alterată, deși numărul total de microorganisme este mai mare, flora este mai puțin variată ca la carnea proaspătă, doar cîteva genuri sînt caracteristice pentru alterarea unui anumit tip de carne. Posibilitatea unei flore mai variate pe carne nealterată poate să reprezinte microorganismele care există în mediul înconjurător al produsului în cauză, sau contaminarea în timpul prelucrării, manipulării, împachetării și înmagazinării.

Se pune atunci întrebarea de ce predomină doar cîteva tipuri de microorganisme în carnea alterată. Este bine să ne întoarcem la parametrii intrinseci și extrinseci care afectează creșterea microorganismelor vinovate de alterare. Carnea proaspătă, păsările și peștele proaspăt au condiții intrinsece favorabile unei flore microbiene foarte variate. Toate au valori ale pH-ului în cadrul limitelor de creștere a majorității microorganismelor enumerate mai sus. În timp ce potențialul de oxidoreducere al cărnii proaspete în ansamblu este scăzut, condițiile O/R la suprafață tind să fie mai ridicate, astfel încît aerobii stricți, anaerobii facultativi, ca și anaerobii stricți găsesc în general condiții de creștere. După examinarea parametrilor extrinseci, temperatura de incubare apare ca un factor foarte important pentru analiza tipurilor de microorganisme care se dezvoltă în carne și preparate atunci cînd acestea se păstrează la temperatura frigiderului.

### 4.3.2.1. **Alterarea cărnii**

Cele mai multe studii privind alterarea cărnii s-au făcut pe carnea de vacă. Totuși carnea de porc, oaie etc. se presupune că se alterează într-un mod asemănător.

După depozitarea prelungită la temperatura 0→+5°C începe alterarea microbiană. În carnea alterată la temperatura frigiderului, investigațiile microbiologice relevă următoarele aproximativ opt genuri de bacterii : Pseudomonas, Achromobacter, Proteus, Micrococcus, Flavobacterium, Aeromonas, Streptococcus și Alcaligenes ; primele două genuri găsindu-se mai frecvent. De asemenea, următoarele șase genuri de mucegaiuri au fost găsite în carnea alterată : Thamnidium, Mucor și Rhizopus care produc „mustăți“ pe carne, Cladosporium care produce „spot negru“, Penicillium care produce pete verzi și Sporotrichum care produce „spot alb“ și doar trei genuri de drojdii în carnea alterată de la frigider : Candida, Torulopsis și Rhodotorula.

Temperatura de incubare pare a fi principala cauză pentru care doar un număr mai restrîns de genuri de bacterii se găsesc în carnea alterată spre deosebire de carnea proaspătă, se selectează psihrofilii.

Feliile de carne tind să sufere o alterare de suprafață, microorganismele alterării fiind bacteriile sau mucegaiurile. Feliile de carne de la frigider, cu umiditate crescută, suferă invariabil, preferențial alterare bacteriană. Caracteristica esențială a acestei alterări este mîzga la suprafață în care se găsesc microorganismele incriminate.

Nivelul relativ crescut al potențialului O/R la suprafața cărnii și temperatura scăzută favorizează toate pseudomonadaceele. Mîzga rezultă din coalescența coloniilor de suprafață și este responsabilă de diminuarea



Scanned with OKEN Scanner

consistenței cărnii. Ayers, în 1960, a arătat că mirosul poate fi detectat atunci cînd numărul total al bacteriilor este între log·7,0—7,5/cm², urmat de mîzga decelabilă la un număr total în jurul a log·7,5—8/cm².

Mucegaiurile tind să domine în cazul feliilor de carne a căror suprafață este prea uscată pentru creșterea bacteriilor sau atunci cînd carnea a fost tratată cu antibiotice, ca de exemplu, tetraciclinele. Mucegaiurile nu se dezvoltă niciodată pe carnea pe care cresc multe bacterii (explicația : bacteriile cresc mai repede decît mucegaiurile consumînd oxigenul de la suprafață de care au nevoie mucegaiurile pentru activitățile lor).

Alterarea și degradarea cărnurilor la 20°C și peste nu se produce la fel ca alterarea la temperatură joasă. La temperatura camerei predomină o floră variată, de tip mezofil. Sporulații aerobi sînt evidenți în cadrul acestei flore, și aceste microorgnisme posedă enzime mai proteolitice decît microorganismele psihrofile.

### 4.3.2.2. Alterarea preparatelor de carne

a) Alterarea preparatelor de carne tocată (cîrnați, salam) : acestea sînt preparate din ingrediente variate, fiecare sau toate putînd să-și aducă aportul de microorganisme în produsul final. Bacteriile, drojdiile și mucegaiurile pot fi găsite în timpul și după prelucrarea cărnii, dar primele două grupuri sînt pe departe cele mai importante în alterarea preparatelor din carne tocată.

Alterarea acestor preparate poate prezenta, în general, trei modificări organoleptice : formarea mîzgăi, acrirea și înverzirea. Alterarea prin formarea mîzgăi se produce la exteriorul învelișului, în special pentru cîrnați și unele salamuri. Din mîzgă pot fi izolate unele drojdii și bacterii din genurile Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus și Micobacterium. S-a arătat că Lactobacillus viridaescens produce atît mîzgă cît și înverzire.

Acrirea se produce în general sub învelișul acestor preparate și rezultă din creșterea lactobacililor, a streptococilor și a altor bacterii.

Atunci cînd produsele sînt păstrate în condiții de umiditate crescută, ele suferă predominant o alterare bacteriană, la care se adaugă frecvent și unele drojdii. Spre deosebire de această situație, alterarea de către mucegaiuri se produce atunci cînd suprafețele salamurilor se usucă, sau atunci cînd produsele sînt păstrate în anumite condiții sau conțin ingredienți ce inhibă bacteriile și drojdiile.

b) Alterarea costiței, slăninei și a șuncii preparate : Cea mai comună formă de alterare a costiței și slăninii este cea prin mucegaiuri (mucegăire și rîncezire) care poate fi datorată genurilor : Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor, Rhizopus, Cladosporium etc. Conținutul crescut în grăsimi le fac oarecum ideale pentru acest tip de alterare, multe mucegaiuri fiind lipolitice. Bacterii din genurile : Streptococcus (în special Enterococii), Lactobacillus, Micrococcus etc. au fost găsite și ele relativ frecvente pe aceste preparate de carne.

Șunca preparată suferă un tip de alterare diferită de cea a șuncii proaspete sau afumate. Aceasta este datorată în principal faptului că soluțiile de preparare injectate în interiorul șuncii conțin zaharuri care sînt



Scanned with OKEN Scanner

fermentate de flora naturală a șuncii și de microorganismele „injectate" odată cu soluțiile de preparare, ca de exemplu, lactobacilii. Zaharurile sînt fermentate producînd „acrirea". Un număr relativ mare de genuri de bacterii au fost implicate ca fiind cauză a alterării „acririi" șuncii, de exemplu : Achromobacter, Bacillus, Psuedomonas, Lactobacillus, Proteus, Micrococcus, Clostridium și alții.

#### 4.3.2.3. Alterarea cărnii de pasăre

Studii privind flora bacteriană a cărnii de pasăre relativ proaspete au arătat prezența multor genuri bacteriene. De obicei, atunci cînd se produce alterarea la temperaturi joase a acestei cărni, primele microorganisme ale alterării aparțin genului Pseudomonas și Achromobacter, apoi Alcaligenes și ocazional micrococi și lactobacili. Cînd sînt utilizate antibioticele, mucegaiurile devin principalii agenți ai alterării. Caracteristica organoleptică importantă a alterării cărnii de pasăre o reprezintă formarea mîzgăi la suprafață externă a bucăților. Cavitatea viscerală manifestă frecvent mirosuri acre, neplăcute. În stadii avansate de alterare, suprafețele pot fi verzui, chiar fluorescente la U. V. Fluorescența este datorată unui număr mare de pseudomonadacee fluorescente.

#### 4.3.2.4. Alterarea peștelui

Peștii conțin în general niveluri crescute de proteine și alți compuși azotați : aminoacizi liberi, amoniac, creatinina, trimetilamină, histamină, acid uric etc.

Bacteriile care pot să existe la peștele relativ proaspăt se găsesc îndeosebi în trei locuri : mîzga exterioară, branhiile și intestinele peștelui. Dacă peștii nu sînt rapid eviscerați bacteriile intestinale vor invada musculatura. Următoarele genuri de bacterii, relativ variate, pot fi găsite în carne de pește, de apă dulce și pește de apă sărată (înșirate în ordine alfabetică) : Alcaligenes, Achromobacter, Bacillus, Corynebacterium, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Gafkya, Micrococcus, Proteus, Pseudomonas, Photobacterium, Kurthia, Seratiia, precum și drojdii.

La peștii alterați flora bacteriană aparține predominant genurilor Pseudomonas și Achromobacter, apoi Flavobacterium, Micrococcus etc. toți aceștia fiind psihrofili.

### 4.3.3. Alterarea legumelor și fructelor

a) *Alterarea legumelor*

Compoziția generală (medie) a legumelor cuprinde aproximativ : apă 88%, carbohidrați 8,6%, proteine 2%, lipide 0,3%, vitamine și minerale aproximativ 1%.



Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere al conținutului nutritiv, pe legume se pot dezvolta bacterii, mucegaiuri și drojdii, dar conținutul crescut de apă favorizează creșterea bacteriilor. De asemenea, nivelul de pH al majorității legumelor este cuprins în nivelul de creștere a unui număr mare de bacterii, acestea fiind agenții comuni ai alterării legumelor.

Pe legumele alterate s-au găsit bacterii din genurile : Erwinia, Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Lactobacillus Bacillus. Dintre acești agenți bacterieni cel mai important este genul Erwinia. Cele 15 specii al genului Erwinia enumerate în Bergey's Manual produc putreziri și ofiliri la legume. Importantă este putrezirea bacteriană moale provocată de Erwinia carotovora și alte specii ; aceste specii distrug pectinele cu apariția unei înmuieri evidente și unui miros urît.

Și mucegaiurile pot participa la alterarea legumelor astfel : genul Botrytis provoacă pe multe legume arii de putrezire gri sau uneori proeminențe gri ; genul Geotrichum provoacă o „putrezire acră, moale, apoasă" ; Rhipzoous provoacă o „putrezire moale", crește ațos cu puncte mici negre (sporangii) pe multe legume ; Alternaria povoacă o „putrezire neagră" etc.

b) *Alterarea fructelor*

Compoziția generală (medie) a celor mai comune fructe cuprinde : apă aproximativ 85%, carbohidrați peste 13%, proteine 0,9%, lipide 0,45%, vitamine și minerale 0,55%.

Datorită pH-ului în general acid al fructelor și conținutului mai mare de glucide, agenții principali de alterare a fructelor sînt mucegaiurile și drojdiile. Cu excepția perelor, care suferă uneori putrezirea dată de Erwinia, bacteriile nu au importanță în inițierea fenomenului de alterare.

O varietate mare de genuri de drojdii pot fi găsite pe fructe și sînt frecvent vinovate de alterarea fructelor, în special pe cîmp ; citățm genurile : Sacharomyces și Torulopsis.

Multe genuri de mucegaiuri sînt frecvent răspunzătoare de alterarea diverselor fructe ; citățm genurile : Penicillium, Boytrytis, Rhizopus, Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Trichotecium etc.

## 4.3.4. Alterarea ouălor

Ouăle sînt un exemplu excelent de produse alimentare care sînt bine protejate în mod normal prin parametrii lor intrinseci (coaja, membranele, lizozimul etc.). Ouăle proaspete sînt în general sterile. Totuși după o perioadă relativ scurtă de păstrare în condiții necorespunzătoare, numeroase microorganisme pot fi găsite la suprafață și pot să pătrundă în ouă, unde vor determina alterarea.

Bacteriile găsite în ouăle alterate fac parte din următoarele genuri : Pseudomonas, Achromobacter, Proteus, Aeromonas, Alcaligens, Escherichia, Micrococcus, Salmonella etc.

Cea mai comună formă de alterare bacteriană a ouălor este putrezirea : putrezirea verde cauzată de Pseudomonas în special Pseudomonas fluorescens ; putrezirea incoloră cauzată de Pseudomonas, Achromobacter și alte bacterii ; putrezirea neagră cauzată de Proteus, Pseudomonas, Aeromonas etc.



Scanned with OKEN Scanner

Alterarea prin mucegaiuri la ouă apare ca spoturi, pete colorate pe fața internă a cojii și pe gălbenuș, datorită dezvoltării coloniilor de mucegaiuri. Dintre mucegaiurile găsite la ouăle alterate fac parte genurile : Cladosporium, Penicillium, Sporotrichum, Thamnidium, Mucor.

### 4.3.5. Alterarea laptelui și lactatelor

Laptele și derivatele fiind alimente foarte bogate în factori nutritivi și cu un conținut mare de apă constituie medii prielnice pentru dezvoltarea microorganismelor saprofite (bacterii, drojdii, inclusiv mucegaiuri), care pot produce modificarea nefavorabilă a însușirilor senzoriale. În condiții obișnuite, însă, aceste microorganisme sînt inhibate de antagonismul microbian și de mediul acid pe care îl creează flora de fermentație lactică normală. Sînt însă frecvente situații cînd, paralel cu această floră sau devansînd-o, se dezvoltă microorganisme nedorite.

În laptele crud ținut la temperatura de frigider, după cîteva zile se pot pune în evidență (depinde de condițiile întîlnite de la recoltare pînă la consumator), cîteva sau majoritatea bacteriilor din următoarele genuri : Streptococcus, Lactobacillus, Pseudomonas, Achromobacter, Leuconostoc, Microbacterium, Propionibacterium, Micrococcus, coliformi (Enterobacter, Escherichia etc.), Proteus, Bacillus, Clostridium etc. Foarte multe din aceste bacterii prezintă activitate predominant proteolotică. Dată fiind originea intestinală a unora din aceste bacterii (Escherichia coli, Proteus, enterococi, Clostridium perfringens) prezența lor arată poluare de origine fecală, constituie un indicator al condițiilor sanitare pe circuitul laptelui.

Pasteurizarea, obligatorie industrial, se aplică pentru a diminua foarte mult numărul de microorganisme saprofite (care acresc sau uneori alterează laptele) și pentru a distruge formele vegetative ale germenilor patogeni, care eventual s-ar găsi în lapte. După pasteurizare mai rămîn însă microorganisme viabile (formele sporulate și bacteriile termofile) și în plus se adaugă, ulterior pasteurizării, floră microbiană de pe circuitul alimentului.

Sporulații și îndeosebi anaerobii datorită particularităților morfofiziologice sînt mult mai puțin influențați de tratamentul termic. Conținutul de Clostridii sulfito-reducătoare și în special Clostridium perfringens, în laptele pasteurizat, constituie un criteriu foarte util de apreciere a gradului de contaminare inițială, veche, a unui lapte termostatat.

Brînzeturile suferă alterare datorită bacteriilor, drojdiilor și mucegaiurilor. Cel mai obișnuit mod de alterare datorită bacteriilor și drojdiilor este cunoscut la brînza de vaci „cu mîzgă". În această situație cele mai incriminate genuri bacteriene sînt : Alcaligenes, Pseudomonas, Achromobacter, sau fungi ca Torulla și Geotrichum (Oidium).

Pe brînzeturile maturate, cu conținut redus de apă se pot dezvolta fungi diverși : mucegaiuri ca Penicillium, Mucor, Geotrichum (Oidium), Cladosporium, mai rar Alternaria, Aspergillus ; sau drojdii ca, Torulla, Rhodotorula, Debaromyces.



Scanned with OKEN Scanner

Unele tipuri de brînză au potențial de oxidoreducere suficient de scăzut pentru a permite creșterea anaerobilor. Nu este deci surprinzător să constatăm că bacterii anaerobe produc uneori alterarea acestor produse. Clostridii sulfito-reducătoare și în special Clostridium butyricum și Clostridium sporogenes alterează unele brînzeturi maturate (caşcaval, brînză olanda, brînză telemea) și provoacă degajare de gaze (balonarea brînzeturilor), înmuierea pastei și apariția de miros înțepător și putrid.

### 4.3.6. Alterarea cerealelor

Dacă cerealele sînt recoltate umede, dacă sînt depozitate în grămezi mari în magazii și silozuri umede și neventilate suficient, apar modificări nedorite, cum sînt încingerea, germinarea, mucegăirea, fermentarea etc.

Pe boabele de cereale și leguminoase uscate sau în făinurile lor, în condiții favorabile de umiditate și temperatură se dezvoltă o varietate largă de mucegaiuri care pot produce micotoxine diverse (vezi capitolul mucegaiuri).

În cereale și derivate se pot dezvolta mucegaiuri din genurile Penicillium, Mucor, Aspergillus, Fusarium, Rhizopus, Cladosporium.

În tabelul nr. XXIX este descrisă microflora dominantă în alterarea unor alimente.

*Tabel nr. XXIX*

**Microflora dominantă în alterarea unor alimente**

| *Alimentul* | *Bacterii* | *Fungi* |
|---|---|---|
| Lapte și brînzeturi | Streptococcus, Lactobacillus Achromobacter, Pseudomonas Flavobacterium, Enterobacter Bacillus, Clostridium | Penicillium, Mucor, Torulla, Oidium, Debaromyces |
| Carne | Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcus, Bacillus | Cladosporium, Penicillium, Thamnidium, Sporotrichum |
| Păsări | Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcus | |
| Pește | Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcus | |
| Mezeluri | Micrococcus, Lactobacillus, Streptococcus | Debaromyces, Penicillium |
| Ouă | Pseudomonas, Achromobacter | Cladosporium, Penicillium, Sporotrichum, Thamnidium |
| Legume | Erwinia, Achromobacter, Flavobacterium, Lactobacillus, Bacillus | Botrytis, Geotrichum, Rhizopus, Alternaria |
| Fructe și sucuri | Acetobacter, Lactobacillus | Sacharomyces, Torulopsis, Botrytis, Penicillium, Rhizopus, Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Trichotecium |
| Cereale | Bacillus | Penicillium, Mucor, Aspergillus, Fusarium, Rhizopus, Cladosporium, Monilia, Helmintosporium |
| Pîine | Bacillus | Penicillium, Aspergillus, Endomyces, Neurospora, Rhizopus |



Scanned with OKEN Scanner

## 4.4. INDICATORI SANITARI MICROBIOLOGICI PENTRU APRECIEREA PRODUSELOR ALIMENTARE

### 4.4.1. Generalități. Controlul microbiologic al produselor alimentare

Controlul microbiologic al alimentelor se impune ca obligatoriu în : acțiunile de supraveghere a salubrității produselor în unitățile mari de fabricație, preparare sau alimentație, aprecierea calității sanitare a unor loturi de alimente destinate consumului uman și determinarea cauzelor unor îmbolnăviri de origine alimentară.

Sursele contaminării alimentelor pot fi : conținutul microbian al materiilor prime și auxiliare ; contaminarea și proliferarea microbiană în timpul păstrării și în timpul prelucrării alimentelor culinare sau industriale, precum și recontaminarea produselor finisate (ambalare, depozitare etc.).

Microorganismele care contaminează alimentele și au o semnificație deosebită pentru sănătatea publică pot fi grupate în două categorii și anume : cele *patogene* și *indicatorii sanitari.* Cea mai mare parte a acestor germeni aparțin familiei *Enterobacteriaceae* și genurilor *Staphylococcus, Bacillus* și *Clostridium.* În plus, poate aduce informații utile pentru cunoașterea calității igienice și stabilității la păstrare a alimentelor și cunoașterea nivelului de contaminare cu grupe de microorganisme mai puțin diferențiate cum sînt germenii aerobi mezofili sau psihrofili, drojdiile și mucegaiurile ș.a.

Pe prim plan în microbiologia alimentelor sînt obiectivele de control microbiologic, *cu pronunțat caracter cantitativ,* atît pentru decelarea germenilor patogeni, cît și pentru cei condiționat patogeni, și saprofiți, care pot deveni și ei nocivi prin însumarea acțiunii lor pe substratul alimentar, și în consecință asupra consumatorului. De aceste aspecte se leagă indicatorii microbieni ai stării igienice sau ai contaminării de origine fecală a produselor alimentare, precum și *normarea microbiologică a alimentelor.*

Există și unele aspecte calitative de care trebuie să se țină neapărat seama. Microflora care contaminează alimentele este de obicei constituită dintr-o multitudine de grupuri sau specii microbiene cu semnificații diferite. În acest scop se folosesc o mare diversitate de medii de cultură și condiții de incubare, cu aplicarea celor trei etape (prezumptivă, confirmare, identificare) etc. În special în cadrul anchetelor epidemiologice a toxiinfecțiilor alimentare, examenul microbiologic al probelor de alimente trebuie să cuprindă calitativ și cantitativ, în mod obligatoriu, toate grupele de microorganisme cunoscute a putea declanșa astfel de îmbolnăviri.

În normarea microbiologică a alimentelor (prevăzută în documente oficiale — standarde, buletine ale Ministerului Sănătății, norme interne etc.), *prima și cea mai importantă condiție microbiologică este lipsa din alimente a germenilor patogeni.*

Pentru alimente ca laptele sau carnea, se cere absența germenilor patogeni la o cantitate de 25 sau 50 grame aliment.

Normele existente impun chiar și la produse perisabile netratate termic, absența salmonellelor la cel puțin 25 grame aliment. Uneori, izo-



Scanned with OKEN Scanner

larea salmonellelor din alimente este relativ dificilă. Astfel, dacă într-un aliment există concomitent un număr mare de alte enterobacteriaceae, decelarea unei minorități de salmonelle devine practic aproape imposibilă. În aceste cazuri este necesar să se utilizeze în paralel mai multe metode de izolare, cu incubări la 37°C și 43°C și să se ia în analiză o cantitate cît mai mare de produs (50 grame sau mai mult).

Datorită inconstanței prezenței lor în alimente și datorită metodelor relativ dificile de punere în evidențiere a germenilor patogeni, *pentru caracterizarea microbiologică a alimentelor s-a acceptat utilizarea unor germeni indicatori.*

*Indicatori sanitari microbiologici :*

Un prim indicator se consideră numărul de germeni din alimente. Cu cît numărul de germeni este mai mare, cu atît se presupune că între ei se găsesc și germeni patogeni. De asemenea, s-a considerat că încărcătura globală atunci cînd depășește anumite limite, este martor al unor condiții de igienă necorespunzătoare pe circuitul parcurs de aliment. Există norme pentru numărul total de germeni aerobi mezofili, maximum admis/g aliment, pentru majoritatea alimentelor.

Un indicator sanitar microbiologic important este și numărul de drojdii și mucegaiuri/g aliment, în special pentru produsele agro-alimentare cu durată lungă de păstrare.

Tot în vederea stabilirii unor criterii de apreciere a calității microbiologice a alimentelor, interesul s-a îndreptat către cîteva grupe de germeni a căror prezență în produsele alimentare reflectă poluarea de origine intestinală, umană sau animală.

### 4.4.2. Examenul cantitativ ca indicator microbiologic sanitar. Numărul total de microorganisme

Determinarea numărului total de microorganisme dintr-un aliment — în afara microflorei industriale — poate da o imagine din punct de vedere cantitativ asupra stării de contaminare. Flora provine din mediul înconjurător și poate contribui, în anumite condiții, la apariția de modificări nedorite.

Noțiunea de indicatori microbiologici cantitativi a mai pornit și de la observațiile experimentale, care au dovedit că anumite alimente sînt obținute steril sau cu un conținut foarte mic de microorganisme și că numărul acestora crește apoi treptat, în raport cu condițiile de manipulare, prelucrare și păstrare. Cînd un aliment devine dubios la examenul organoleptic și fizico-chimic, el prezintă cel mai adesea un mare număr de microorganisme.

Numărul total de germeni în produsele alimentare nu reflectă numai condițiile de manipulare, prelucrare, păstrare, ci poate să reflecte și starea de degradare sau gradul de prospețime, calitatea sanitară a alimentelor. Unii autori au atras atenția că numărul total de germeni evaluează mult mai eficace calitatea sanitară a alimentelor care nu oferă suport material dezvoltării microorganismelor. În alimente de acest fel (uscate, înghețate) numărul de germeni poate să indice eficacitatea condițiilor de igienă în



Scanned with OKEN Scanner

etapele de prelucrare, transport, înmagazinare a alimentelor. Același lucru poate fi valabil și în cazul alimentelor proaspete, cînd este de dorit să stabilim un criteriu care să fie utilizat ca indicator al duratei de conservare.

Totuși, numărul total de germeni, ca indicator al calității sanitare a alimentelor, uneori, nu este așa de fidel și demn de luat în considerare, pentru că numărul total de germeni include și agenții patogeni microbieni. Or, un număr total de germeni scăzut nu indică totdeauna existența unor alimente corespunzătoare din punct de vedere igienico-sanitar, pentru că în anumite condiții de păstrare a alimentului la temperaturi scăzute, care nu permit multiplicarea agenților patogeni, acești agenți patogeni existenți în aliment îl fac necorespunzător sanitar. Un astfel de aliment dat în consum, în absența modificărilor organoleptice, poate declanșa îmbolnăviri.

În studiul lor pe preparate de ouă înghețate, Montford și Thatcher (1961) au reușit să izoleze salmonelle dintr-un preparat cu un număr total de germeni de numai 380/g și din alte preparate cu număr de germeni sub 5 000/g.

Pentru aprecierea calității microbiologice a unui aliment, întotdeauna numărul total de germeni trebuie asociat și cu alți indicatori sanitari.

*Numărul „total" de germeni nu este atotcuprinzător, este „total" în limita strictă a condițiilor de determinare (temperatură, substrat, timp etc.), condiții care trebuie specificate,* de exemplu : numărul total de germeni aerobi mezofili, număr total de germeni psihrofili, număr total de germeni termofili, număr total de germeni proteolitici etc.

La noi în țară sînt normate majoritatea sortimentelor alimentare pentru *numărul total de germeni aerobi mezofili.*

La numărarea microorganismelor se obțin deseori variații mari, de cele mai multe ori datorate erorilor de tehnică, sau uneori pricinuite de anumite caracteristici ale produsului cercetat (neuniformitate fizică, repartizare inegală a bacteriilor în alimente, activitate antimicrobiană a alimentelor etc.).

Subliniem că, condițiile de execuție trebuie să fie ireproșabile : începînd cu recoltarea (probe semnificative), transportul probelor la laborator, pregătirea lor pentru analiză (cu omogenizarea obligatorie), efectuarea corectă a diluțiilor probe duble, condițiile de incubare etc., toate conform standardelor în vigoare.

În legătură cu temperatura și timpul de incubare pentru aprecierea numărului total de germeni aerobi mezofili, sînt recomandate două incubări : 37°C — 48 h și 32°C — 72 h.

După majoritatea autorilor, temperatura ideală de incubare pentru „numărul total de microorganisme" este 32°C în microbiologia alimentelor. La această temperatură se dezvoltă un număr maxim de mezofili și sînt cuprinși și o parte dintre psihrofili (atît de frecvenți în alimente), precum și o parte dintre bacteriile termofile.

În cadrul numărului de microorganisme un indicator sanitar microbiologic foarte important este și numărul de drojdii și mucegaiuri. Prezența fungilor în număr mare informează despre antecedentele improprii de igienă ale produselor și permite aprecieri privind consumabilitatea lor



Scanned with OKEN Scanner

(deseori mucegaiurile și drojdiile sînt implicate în alterarea unor alimente). Există norme pentru produsele cele mai expuse contaminării fungice, ca de exemplu produsele agro-alimentare, care sînt depozitate o durată mai lungă (cereale și derivate, leguminoase uscate, condimente etc.), sau alimentele supuse unui proces de maturare în timpul preparării (brînzeturi maturate, de exemplu), cît și pentru alte produse alimentare. Se exclud din discuție microorganismele fungice utilizate industrial.

Cerealele și leguminoasele uscate, precum și derivatele lor, de exemplu, fiind sărace în apă, sînt improprii pentru dezvoltarea bacteriilor patogene, însă pe ele se pot dezvolta frecvent mucegaiuri, iar multe din aceste mucegaiuri, în anumite condiții, secretă diverse micotoxine.

În privința normelor de mucegaiuri, enunțăm aici doar o normă folosită frecvent internațional. Majoritatea țărilor dezvoltate prevăd pentru făinurile vegetale un număr de mucegaiuri maxim admis de 1 000/g aliment.

Încărcătura fungică dintr-un aliment este considerată un indicator de latență a potențialului micotoxinogen al acestor produse, iar proporția tulpinilor aflatoxinogene exprimă iminența riscului în condiții microecologice favorizante. Totuși, indicatorii de certitudine sînt reprezentați doar de conținuturile de micotoxine existente în produs.

### 4.4.3. Bacterii folosite ca indicatori de contaminare fecală a alimentelor

Pentru ca un microorganism să fie acceptat ca indicator de contaminare fecală este necesar să îndeplinească anumite condiții, arătate la capitolul de Microbiologia apei.

Bacteriile care răspund acestor criterii și constituie indicatori de contaminare fecală sînt : bacteriile coliforme cu Esch. coli în particular, Enterococii, bacteriile din genul Proteus, Clostridiile sulfito-reducătoare cu Cl. perfringens în particular etc.

Se consideră că lactobacilii aerobi (din genul Bifidabacterium) și bacilii anaerobi din familia Bacteroidaceae (genul Bacteroides) constituie flora cu adevărat normală, autohtonă a tractului intestinal. Celelalte bacterii obișnuite (enterococii, clostridiile și enterobacilii Gram-negativi, în particular Esch. coli, Proteus) se găsesc în cantități mai mici decît primii. Deși răspund la criteriul de specificitate și desime/g, lactobacilii anaerobi (Bifidabacterium) și bacilii anaerobi din familia Bacteroidaceae nu pot fi folosiți ca indicatori sanitari nerăspunzînd celorlalte criterii (rezistență în mediul extern și ușurință de punere în evidență).

Unii indicatori de contaminare fecală au și o semnificație epidemiologică deosebită, ne pot informa despre originea umană sau animală a contaminării, despre vechimea contaminării (recentă sau veche), precum și despre originea sigur intestinală sau eventual originea telurică a contaminării.



Scanned with OKEN Scanner

S-a constatat în multe situații că punerea în evidență a bacteriilor indicatori ai contaminării fecale a alimentelor demonstrează de fapt două fenomene riscante, o infecție inițială și o proliferare ulterioară favorizate de condițiile tipice existente la anumite alimente.

### 4.4.3.1. Bacteriile coliforme ca indicatori sanitari ai contaminării fecale a alimentelor

Utilizarea în scop practic a acestui indicator datează de aproape 100 de ani. „Bacterium coli" — s-a folosit pentru prima dată la aprecierea potabilității apei (Nacé, 1888). Apoi s-a extins utilizarea acestui indicator la lapte (Wyss, 1899) și carne (Kraus, 1890); autori citați de M. Knorr (Arch. J. Hyg.u. Bakt., 1952).

Coliformii reprezintă o grupare tradițională, care oferă facilități la interpretarea rezultatelor în bacteriologia sanitară.

Germenii coliformi reprezintă un *grup relativ heterogen,* care cuprinde bacterii din genurile: *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter* și *Klebsiella* (speciile urează pozitive). Menținem această grupare folosită de Mossel, întrucît în microbiologia alimentelor este semnificativă și convenabilă pentru practici curente de izolare prin teste de colimetrie.

Din acest grup heterogen doar Esch. coli constituie indicator sigur de contaminare fecală, ceilalți pot avea și alte proveniențe decît cea intestinală. Esch.coli sînt bacterii coliforme care la 44,5±0,5°C fermentează lactoza cu producere de gaz și formează indol din triptofan. Se acceptă în prezent că Esch. coli constituie indicatorul cel mai bun al contaminării fecale dintre indicatorii sanitari microbiologici.

Viabilitatea bacteriilor coliforme în diverse alimente depinde de compoziția în factori nutritivi, factorii antimicrobieni, pH-ul alimentelor, concentrația de sare, temperatura de păstrare etc.

Diverși autori semnalează că la lapte și unele derivate lactate (iaurt, brînză) se remarcă o scădere a numărului de Escherichia coli, în special din cauza acidității crescute și antagonismului cu lactobacilii, în timp ce în laptele cu ciocolată și smîntînă există o prelungire a viabilității pe care autorii o pun pe seama unei acțiuni protectoare din partea grăsimilor. Datele în legătură cu viabilitatea coliformilor în alimente sînt importante pentru interpretarea unui examen microbiologic, deoarece uneori numărul lor este influențat, după un anume timp putînd apărea o scădere sau chiar o dispariție a lor (cazul iaurtului și a brînzei proaspete de vaci păstrate la temperatura frigiderului, sau a brînzei telemea în timpul maturării).

În cercetări făcute de Ieniștea pe brînză telemea de oi, s-a constatat că în decursul maturării scade numărul bacteriilor coliforme de la 1 milion/g cît erau la 24 ore după preparare, la 53/g după 21 zile de maturare, pentru ca după 120 zile să fie absente.

Ieniștea și Giurgea, în 1957, au urmărit viabilitatea bacteriilor Escherichia coli și Klebsiella aerogenes, păstrate în soluție de NaCl 18% sterile și în saramuri de pește sterilizate și păstrate la diverse tempera-



Scanned with OKEN Scanner

turi. În saramurile de pește s-a observat o reducere numerică a acestor bacterii, în raport cu gradul de contaminare, vîrsta celulelor și temperatura de păstrare.

Viabilitatea bacteriilor este maximă la 10°C și scade la 22°C, respectiv 37°C. Escherichia coli a supraviețuit mai mult decît Klebsiella aerogenes, Ieniștea a mai constatat că saramurile de pește (în care persistă factori nutritivi) sînt un mediu mai bun de conservare a bacteriilor coliforme decît soluțiile saline care au aceeași concentrație de NaCl.

La pește, testul colimetriei este privit de diverși autori ca probă de control a modului de manipulare. Watanabe și Ulstrup (1973) cercetează numărul de coliformi/cm$^2$ suprafață pește la 134 probe și găsesc o valoare medie de $2{,}5 \times 10^4$ coli/cm$^2$.

Congelarea afectează bacteriile coliforme, scăderea numărului de bacterii în urma congelării s-a semnalat de diverși autori atît la alimente de origine animală, cît și la produse vegetale. Astfel, experiențe făcute pe bulion de pasăre, contaminat cu $5 \times 10^6$ bacterii coliforme/ml, au scos în evidență că după 480 zile de conservare la —21°C au rămas numai 66 coli/ml.

Din aceste exemple, rezultă ideea că interpretarea prezenței bacteriilor coliforme trebuie făcută în raport cu situațiile din timpul controalelor.

Subliniem că *prezența bacteriilor coliforme în alimente netratate termic* permite aprecierea că nu au fost riguros respectate condițiile de igienă pe traseul parcurs de aliment, iar în cele *prelucrate termic* că exigența bacteriologică a fost insuficientă în procesul tehnologic respectiv (tratament termic și răcire consecutivă inadecvate, recontaminare ulterioară).

*Nivelul lor cantitativ este reglementat oficial* pentru aproape toate sortimentele alimentare.

### 4.4.3.2. Enterococii ca indicatori sanitari de contaminare fecală

Enterococii sau streptococii fecali au fost prima dată descriși de Thiercelin în 1899, apoi de Andrews și Horder în 1906, ca un grup de streptococi caracteristici pentru intestinul uman și animal.

Rezistența la acțiunea temperaturii și la condițiile nefavorabile de cultură sînt caracteristice grupului Enterococcus (Sherman, 1937). După clasificarea antigenică a lui Lancefield, enterococii aparțin grupului serologic D.

Studierea proprietăților fiziologice și serologice ale speciilor ce alcătuiesc grupul D Lancefield, numiți grupul Streptococilor fecali, a permis lui Schatok să-i claseze în trei subdiviziuni :

a) Streptococcus faecalis cu varietățile Zymogenes și liquefaciens ;
b) Streptococcus faecium și Streptococcus durans ;
c) Streptococcus bovis și Streptococccus equinus.



Scanned with OKEN Scanner

Speciile ce alcătuiesc ultima diviziune (Str. bovis și Str. equinus) sînt mai puțin rezistenți ca precedenții, nu răspund la caracteristicile lui Sherman pentru grupul Enterococcus și nu cultivă în mediul cu azid și etil violet.

Primul element care justifică folosirea enterococilor ca indicatori sanitari este habitatul germenilor din acest grup. Enterococii, saprofiți obișnuiți ai intestinului omului și animalelor, au fost găsiți constant în fecale umane și animale, în apele de canal, în apele, solurile și alimentele contaminate cu materii fecale.

Studii pentru cuantificarea streptococilor fecali, căutarea unor tehnici de enterococometrie, au început aproximativ în 1940.

Primul studiu comparativ al coliformilor și enterococilor ca indicatori de contaminare fecală pentru alimente a fost făcut de Burton (1949).

Enterococii ca și coliformii au habitat intestinal și nu se găsesc decît în substraturile poluate, sînt prețioși indicatori de contaminare fecală a apei, solului și alimentelor, dar sînt mai dificil de determinat decît coliformii, acest fapt explicînd utilizarea lor ceva mai rară decît a bacteriilor coliforme.

Situația enterococilor ca indicatori sanitari la alimente este puțin diferită față de aceea de la apă.

Dacă punerea în evidență a enterococilor în apă ar putea fi considerată ca un indicator de contaminare fecală recentă, fiindcă aceste specii au o slabă rezistență de supraviețuire în medii sărace în substanțe organice, prezența lor în alimente nu are această semnificație, în alimente enterococii găsind suficient substrat nutritiv și fiind de obicei mai rezistenți decît coliformii.

În general, enterococii sînt mai rezistenți decît bacteriile coliforme la condiții de mediu extern și anume : suportă uscăciuni prelungite, sînt mai rezistenți la clorinare, supraviețuiesc timp mai îndelungat la temperaturi joase, rezistă 30 minute la 60°C, iar unele specii sînt rezistente și la 70—75°C, rezistă la concentrații mari de sare, cresc la pH-uri foarte diferite (de la pH-uri acide 3,5—4 pînă la pH 9,6).

*Datorită rezistenței particulare la o serie de factori, prezența enterococilor cîștigă în semnificație pentru alimente prelucrate termic, acide, sărate, uscate, refrigerate.*

Ieniștea (1967), urmărind viabilitatea Str. faecalis într-o soluție de NaCl 18% și în cîteva saramuri de pește sterilizate, a remarcat o viabilitate mai mare pentru Str. faecalis decît la Proteus și la Enterobacter aerogenes.

Diverși autori au arătat că enterococii supraviețuiesc timp îndelungat la temperaturi joase și pot constitui pentru produsele alimentare congelate un indicator de contaminare mai sensibil și mai util decît coliformii.

Primul studiu comparativ între coliformi și enterococi în alimente a fost efectuat de Burton în 1949, pe 376 probe de legume congelate. După un an de depozitare la —20°C, au supraviețuit 90% din enterococii inițiali, și doar 60% dintre coliformi. În același studiul Burton a arătat că germenii coliformi reprezintă un indicator mai eficient decît entero-



Scanned with OKEN Scanner

cocii, pentru perioada anterioară congelării (legumele proaspete), în timp ce enterococii sînt indicatori mai utili decît coliformii la alimente congelate și depozitate.

Hartman (1960), într-un studiu pe patéu de pui congelat, a găsit că numărul de enterococi era mai strîns corelat cu numărul total de germeni, decît cu numărul de coliformi. Rezultatele acestui autor sînt în concordanță cu studiile și rezultatele lui Larkin (1955), Kereluk și Gunderson (1959), Lavine (1961), respectiv : în alimentele congelate enterococii se găsesc într-un număr mai mare decît coliformii.

Enterococii supraviețuiesc în multe produse alimentare care au proprietăți inhibitoare pentru grupul coliformi (sucul de citrice, fructe congelate, carnea sărată etc.), de asemenea, rezistă mai mult decît coliformii în alimente prelucrate termic de tip pasteurizare sau „opărire" (mezeluri, șuncă, lapte pasteurizat), în alimente uscate (lapte praf, ouă praf), în diverse saramuri etc.

Enterococii ca indicatori sanitari de contaminare fecală *ne pot informa și despre originea umană sau animală a contaminării.* Astfel, Streptococcus faecalis și varietățile sale zymogenes și liquefaciens apar mai specifici pentru tractul intestinal al omului, decît alți enterococi, arată contaminare umană, în timp ce Streptococcus faecium arată o contaminare predominant de origine animală.

Se cunoaște un test relativ simplu de diferențiere : Streptococcus faecalis și varietățile sale produc formazan roșu din clorură de trifeniltetrazolium, spre deosebire de Streptococcus faecium, care nu produce formazan pe medii cu T.T.C.

### 4.4.3.3. **Bacteriile din genul Proteus ca indicatori sanitari**

Tulpinile de Proteus sînt foarte răspîndite în natură, în materii organice în descompunere, ape poluate și de canal, materii fecale, alimente alterate, în special carne și preparate de carne, ouă etc.

Frecvența bacteriilor din genul Proteus într-un mediu este determinată, în bună parte, de existența substanțelor proteice în diferite faze de descompunere : de altfel, se știe că echipamentul enzimatic al B. proteus acționează, nu atît asupra moleculelor mari de proteine, cît mai ales asupra stadiilor de proteoliză (polipeptide, peptone, aminoacizi), nutriția sa depinzînd de o serie de factori de creștere (aminoacizi specifici, acid nicotinic, acid pantotenic etc.). În asemenea condiții favorabile este posibilă înmulțirea luxuriantă, iar determinarea cantității sale devine semnificativă, nu pentru masivitatea contactului contaminat, ci mai ales pentru intensitatea proceselor de descompunere a substanțelor organice din substrat. Acesta este și motivul care face pe unii cercetători să-l izoleze frecvent numai dacă folosesc în analiză, fie cantități mai mari de produs, fie tehnici speciale.

În microbiologia alimentelor, utilizarea bacteriilor din genul Proteus ca indicator sanitar prezintă avantajul de a arăta o *contaminare recentă de origine fecală,* survenită în diferite etape ale circuitului alimentelor, iar titrul lor trebuie interpretat în limita faptelor arătate mai sus.



Scanned with OKEN Scanner

În sprijinul afirmației că arată o contaminare recentă, stau două argumente : rezistența scăzută a bacteriilor din genul Proteus în mediul extern și faptul (deja enunțat), că enzimele acestor bacterii, acționează îndeosebi asupra primelor stadii de descompunere a proteinelor.

În alimente, diferențierea provenienței animale sau umane a contaminării de origine fecală este deosebit de utilă pentru sanitație și există aprecierea că în acest sens pot furniza indicații respectiv, *Proteus vulgaria — contaminare animală și Proteus mirabilis — contaminare preponderent de origine umană.*

### 4.4.3.4. Clostridiile sulfito-reducătoare

Din numărul mare de specii ale genului Clostridium, în cazul alimentelor, pentru analizele făcute cu scop de control al calității sau în cadrul anchetei epidemiologice, se urmărește punerea în evidență a Clostridiilor sulfito-reducătoare și a speciei Clostridium perfringens (sinonim welchii).

Primii autori care au descris Clostridium perfringens au fost Welch și Nuttal, în 1892. Ei l-au izolat din gangrena gazoasă și i-au dat denumirea de Bacillus aerogenes capsulatus. Ulterior, a fost denumit Clostridium welchii, apoi Clostridium perfringens.

În general creșterea bacteriilor din genul Clostridium este favorizată de adausul unor substanțe reducătoare cu sulfiți, compuși din fier redus, acizi grași nesaturați, cisteină, acid ascorbic, acid tioglicolic, sau, cu rol asemănător, carnea tocată și prăjită.

*Clostridiile sulfită-reducătoare,* cum sînt speciile Cl. perfringens, Cl. sporogenes, Cl. acetobutylicum, Cl. botulinum, Cl. roseum etc., apar întotdeauna de culoare neagră în medii adecvate cu sulfit de sodiu, aspectul coloniilor în profunzimea mediului fiind lenticulare, sferice sau lobate.

După unii autori, în alimente, Clostridium perfringens formează peste 90% dintre clostridiile sulfito-reducătoare.

*Clostridium perfringens* face parte din microflora intestinală umană și animală, este foarte răspîndit în mediul extern, în pulberi, pe sol, în apă, ca și pe alimente (pe legume, în lapte proaspăt, lapte condensat, brînzeturi, conserve, carne, păsări, mezeluri, pește etc., sub forma sa vegetativă sau ca spor). Clostridium perfringens a fost descris de diverși autori, în multe alimente cu diferite grade de prospețime și în alimentele alterate.

În ceea ce privește valoarea ca indicator sanitar a germenului Clostridium perfringens, în comparație cu bacteriile din grupul coliform, cu enterococii și cu bacteriile din genul Proteus, Clostridium perfringens își dovedește valoarea sa de indicator sanitar microbiologic de contaminare a alimentelor datorită existenței sale în materiile fecale ale omului și animalelor. Fiind însă o bacterie sporulată care supraviețuiește foarte mult timp în condiții diferite de mediu, unii autori au rezerve cînd o găsesc ca singura prezentă dintre bacteriile indicatoare. În asemenea cazuri este vorba de o contaminare care a avut loc mai de mult, așa că în



Scanned with OKEN Scanner

momentul cercetării este posibil ca orice microorganism patogen care ar fi existat să fi dispărut și deci, apa sau produsul alimentar să nu mai prezinte vreun pericol pentru consumator. Din această cauză, subliniem din nou, că la analiza unui produs alimentar, ca și la analiza apei, trebuie să se caute în paralel două sau mai multe bacterii indicatori.

*Dintre bacteriile descrise* în capitolele precedente ca *indicatori sanitari microbiologici, Clostridium perfringens este cel care poate demonstra cea mai veche contaminare,* în contrast cu Proteus, indicator al unei foarte recente contaminări, sau al unui început de alterare.

Rezistența mare a sporilor de Clostridium perfringens, timp de 10 luni, chiar în condiții de aerobioză, demonstrată de Weinberg și colab. (1937), explică și mai bine de ce această bacterie poate indica cea mai veche contaminare.

Sporii de Clostridium perfringens sînt rezistenți la temperaturi ridicate. După diverși autori, ei rezistă 10—90 de minute la fierbere, în funcție și pH-ul alimentului. Barnes (1963), într-un studiu pe tulpini de Clostridium perfringens tip A care au provocat toxiinfecții alimentare în Anglia, găsește că sporii acestor tulpini rezistă la fierbere 1—3 ore.

Prezența Clostridiului perfringens în alimente poate arăta o contaminare fecală veche, anterioară prelucrării termice de tipul pasteurizărilor.

Conținutul de Clostridii sulfito-reducătoare și în special de Clostridium perfringens, se modifică mult mai puțin decît titrul coli prin termotratamentul laptelui ; Clostridium perfringens constituind un indicator al contaminării inițiale a laptelui pasteurizat.

Clostridiile sulfito-reducătoare au o valoare ecologică interpretativă — limitată de faptul că proveniența lor în alimente nu este numai din contaminare fecală, ci uneori au origine telurică, și întrucît ele se pot înmulți în aliment, iar numărul lor devine semnificativ numai dacă depășește $10^2$ celule/g, cînd pot apare modificările de alterare, precum și eventual riscurile pentru consumator (toxiinfecția alimentară).

Clostridium perfringens poate fi găsit în multe alimente, dar pentru a provoca toxiinfecție alimentară este necesar un număr mare de asemenea microorganisme (cca. $10^6$/g aliment).

Cele mai bune condiții de multiplicare le găsește în produse bogate în proteine și lipide (mîncăruri cu carne, pasăre, pește, fasole etc.) și care, după tratamentul termic sînt răcite lent și se păstrează la temperaturi ridicate (40—50°C), sau se reîncălzesc. Sporii de Clostridium perfringens fiind termorezistenți suportă uneori, „șocul termic", iar germinarea lor poate fi stimulată prin lipsa competițională a microorganismelor aerobe și prin păstrarea alimentului la temperatură ridicată. Toxiinfecțiile alimentare cu Clostridium perfringens sînt în general afecțiuni ușoare, de scurtă durată, manifestate de obicei numai prin colici și diaree.

În produse alimentare perisabile ca : laptele praf, brînzeturi, mezeluri, păsări fripte, pește afumat etc., clostridiile sulfito-reducătoare nu trebuie să depășească $10^2$/g de produs.

La fabricarea conservelor se iau toate măsurile pentru reducerea titrului de spori din materia primă și se aplică un barem de autoclavare care să distrugă sporii de Clostridium botulinum. La examenul prin cul-



Scanned with OKEN Scanner

turi a conservelor, nu trebuie să se pună în evidență bacterii sporulate anaerobe sau facultativ anaerobe, bacterii nesporulate, bacterii termofile de acrire etc.

În concluzie, privind indicatorii sanitari microbiologici, subliniem că la analiza unui produs alimentar trebuie să se caute în paralel două sau mai multe bacterii indicatoare de contaminare fecală. Prezența a doua asemenea bacterii în aliment în raport cu cantitatea lor, confirmă mai bine contaminarea cu materii fecale a unui produs alimentar. S-a arătat că unii indicatori sanitari au și o semnificație epidemiologică deosebită, ne pot informa despre originea umană sau animală a contaminării, despre vechimea contaminării, precum și despre originea sigur intestinală sau eventual originea telurică a contaminării.

Un examen microbiologic corect va cuprinde și analiza toți indicatorii sanitari microbiologici, iar cea mai importantă condiție microbiologică este lipsa din alimente a germenilor patogeni.

Totdeauna, datele examenului microbiologic trebuiesc corelate cu datele examenului organoleptic și ale analizelor fizico-chimice și numai după aceea se va hotărî asupra destinației produsului controlat.

## 4.5. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ȘI DERIVATELOR

Pentru determinarea calității laptelui de consum, se efectuează examenul microbiologic, care se adresează mai ales laptelui pasteurizat sau sterilizat. Pentru laptele crud, examenul microbiologic se execută mai ales pentru cercetarea determinării unor microorganisme patogene provenite de la animale bolnave, sau se determină încărcătura inițială a laptelui supus prelucrării.

### 4.5.1. **Recoltarea probelor** — se execută conform STAS 6349/1-80

Pentru produsele în ambalaje pînă la 1 kg, proba va fi constituită din ambalajul original. Din ambalajele mai mari de 1 kg se recoltează în mod aseptic în recipienți sterili cîte o probă de 250—500 g sau ml produs. Operațiunea de deschidere a recipienților cu probe sau a ambalajelor care conțin probele, pregătirea probelor și analiza microbiologică se execută numai în laboratoare specializate. Transportul la laborator trebuie făcut în minimum de timp, 1—2 ore, sau în condiții de refrigerare.

Probele trebuiesc introduse în lucru imediat și dacă nu este posibil se păstrează la 2—4°C și se vor introduce în lucru astfel :

— în maximum 4 ore pentru produse proaspete (lapte, iaurt, smîntînă, kefir, sana, brînză de vaci etc.) ;

— în maximum 24 ore pentru celelalte produse (brînzeturi, unt, lapte praf etc.).



Scanned with OKEN Scanner

Pentru introducerea în lucru a laptelui și produselor lactate sînt necesare cîteva operații suplimetare :

— laptele și produsele se omogenizează prin agitare înainte de recoltare, diluțiile se efectuează cu ser fiziologic peptonat 1% steril ;

— smîntîna, mai ales dacă este îngroșată, se fluidizează în baia de apă la 47°C±1°C și se omogenizează. Diluțiile se execută cu soluție citrat de sodiu 2% sterilă ;

— înghețata se topește într-un recipient la temperatura de 47°C și se omogenizează, sfărîmînd eventualele glazuri sau adaosuri, diluțiile efectuîndu-se cu ser fiziologic peptonat 1% ;

— brînzeturile se triturează în mojar steril, se omogenizează, fie cu soluție de citrat de sodiu 2%, fie cu fosfat de potasiu bibazic 2%, încălzite la 47°C, diluțiile efectuîndu-se cu același diluant.

La produsele lactate sub formă de praf (lapte praf, zară și zer praf), ca și cazeina alimentară, se folosesc următoarele soluții diluante de reconstituire :

— pentru lapte praf, zer praf, zară praf, se folosește soluția de citrat de sodiu 2% ;

— pentru produsul cazeolact se folosește soluția tampon fosfat pH = 7, sterilă ;

— pentru cazeină alimentară se folosește soluția de fosfat de potasiu bibazic 2%, sterilă.

Reconstituirea se face în vase sterile cu perle de sticlă și diluantul adecvat, la temperatura de 47°C la baia de apă. După aceasta se fac diluțiile ca la produsele fluide.

— Untul se recoltează din proba adusă în cantitate de 10 g și peste aceasta se adaugă 20 ml ser fiziologic peptonat 1%. Eprubeta se menține la baia de apă (47°C) pînă la topirea completă și prin rotirea ei se obține și omogenizarea amestecului. Se menține în continuare eprubeta la baie pînă la separarea completă a grăsimii de plasmă. Analiza se execută asupra plasmei știind că 2 ml lichid corespunde la 1 g unt, diluțiile se fac cu ser fiziologic peptonat 1%, steril.

### 4.5.2. Determinarea numărului total de germeni

Reprezintă determinarea cea mai uzuală și care ne aduce informațiile cele mai generale, dar în același timp și primele date asupra calității laptelui. Încă dinainte de 1900, metoda NTG este propusă ca indicator pentru aprecierea calității laptelui. Așa cum am menționat, numărul de germeni existenți într-un produs este o cifră în permanentă evoluție în plus sau în minus, în funcție de foarte mulți factori : temperatura de păstrare, timp, natura produsului, concurența microbiană etc. Din această cauză laptele și produsele sale proaspete, trebuiesc introduse în lucru chiar în condiții de refrigerare, în maximum 4 ore de la recoltare.

NTG este important și pentru faptul că s-a observat că există o proporționalitate directă între acesta și fenomenul de alterare microbiologică a laptelui.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru determinarea acestui indicator cantitativ microbiologic s-au utilizat în decursul timpului foarte multe metode, dar datorită faptului că fiecare are punctele ei slabe și mai ales că nu s-a găsit metoda ideală, instantanee, care să numere cu precizie cîți germeni vii sînt pe unitatea de volum sau greutate, metodologia NTG este destul de diferită în țările care o au ca normă.

Începuturile au fost făcute prin metodele de numărare directă pe lamă care au avantajul rapidității, al informațiilor rapide asupra speciilor microbiene existente, dar este imperfectă prin coeficientul mare de eroare și mai ales prin faptul că la colorare apar și microorganismele moarte, unele particule îngreunează și măresc artificial numărul de germeni, etc. Are însă avantajul rapidității și al constatării imediate a infestării cu drojdii și mucegaiuri, clostridii etc.

Metoda Breed (1911), este prima încercare de standardizare a numărării directe pe lamă a bacteriilor din lapte, după etalarea pe lamă a unei cantități crescute de lapte, degresare și colorare cu un colorant special pe bază de albastru de metilen. În încercarea de a colora separat bacteriile vii de cele moarte, Proca (1909), Beattie (1972) propun folosiera a 2 coloranți albastru Löffler și fuxina Ziehl, cunoscînd faptul că bacteriile moarte pierd culoarea albastră și se colorează în roșu cu fuxină, pe cînd cele vii păstrează culoarea albastră.

Aceste metode, ca și multe alte modificări ale lor, nu au dus la rezultate satisfăcătoare, în așa fel încît la standardele moderne la lapte nu este prevăzută, rămînînd pentru alte produse ca o metodă de informație rapidă asupra calității microbiologice (la carne, conserve). Cercetări comparative făcute asupra acestor metode, față de metoda cutiilor Petri (metoda Koch), au arătat că se obține un număr mult mai mare de germeni prin metoda frotiurilor într-un raport de 1 : 2 pînă la 1 : 4.

Metoda numărătorii microorganismelor în celule de numărat dă rezultate mai bune în cazul drojdiilor și mucegaiurilor, decît al bacteriilor, deoarece acestea sînt prea mici pentru a putea fi observate necolorate.

Cea mai corespunzătoare metodă folosită este metoda cutiilor (Koch) care pleacă de la observația că din fiecare germen pus în condițiile favorabile de dezvoltare ia naștere o colonie, existînd un raport direct între numărul coloniilor vizibile și numărul de germeni din care au provenit. Deci, dacă din diluțiile decimale ale produsului nostru se însămînțează cantități cunoscute în plăci, unde se face încorporarea în mediu nutritiv adecvat, se pot număra coloniile crescute și prin corecția factorilor de diluție se poate exprima numărul de germeni pe unitatea de produs.

Sînt multe cerințe care trebuiesc respectate cu strictețe pentru obținerea unor rezultate corecte :

— toată sticlăria (pipete, eprubete, plăci) trebuie să fie foarte curată, degresată, neutră, perfect calibrată (atenție la pipete ciobite sau cu gradații deteriorate) ;

— să fie folosit pentru diluție lichidul care convine cel mai bine pentru produsul cercetat ;

— efectuarea diluțiilor să fie corectă și cu cea mai mare precizie ; se folosește pentru fiecare diluție o pipetă cu ajutorul căreia se execută omogenizarea diluției (prin aspirare de cca 10 ori), însămînțarea în placă și în diluția următoare ;



Scanned with OKEN Scanner

— de la introducerea în placă și pînă la încorporarea ei în mediu nutritiv să nu treacă peste 15 minute ;

— cantitatea de mediu nutritiv turnată în plăci să fie între 10—15 ml, topit și răcit la 45°C ;

— amestecul diluției cu mediul nutritiv se face prin mișcări de balans, în lungul a două diametre perpendiculare (cîte 5) și mișcări de rotații (cîte 5) în sensul acelor de ceasornic și invers. Se lasă în repaos pentru solidificare ;

— pentru fiecare diluție se fac 2 probe ;

— incubația se face la termostat la 30°C timp de 72 h sau la 37°C timp de 48 h ;

— pentru citire se iau în considerare numai plăcile care au între 30 și 300 colonii pe o placă, la examinarea cu lupa.

Pentru obținerea rezultatului, se calculează media aritmetică a cutiilor Pétri inoculate cu aceeași diluție (să nu fie diferențe mai mare de $\pm$ 10%), numărul găsit se înmulțește cu factorul de diluție respectiv. Se face apoi media diluțiilor și se obține astfel NTG aerobi mezofili pe ml sau g produs.

Studii ale diverșilor autori au arătat că există multe și mari erori la exprimarea și calcularea NTG. Unele țin de factorii materiali (cele mai multe cauze au fost enumerate mai sus), altele țin de factori biologici individuali. Acestea din urmă sînt cu atît mai mari, cu cît numărul de colonii cercetate este mai mare. Erori de $\pm$ 30% ar fi obișnuite și dacă ținem seama de variația individuală a responsabilității numărătorii, erorile pot ajunge la $\pm$ 90%. Recent, au apărut aparate electronice de numărat colonii, care reduc aceste erori la valori acceptabile ($\pm$ %).

Unele variante, față de această metodă a încorporării diluțiilor, nu s-au dovedit mai bune.

Nici metoda striurilor pe placă, din cantități mici de lapte (0,1 ml), nici metoda picăturilor (0,1 m) din diluții de lapte puse direct pe suprafața unor plăci cu mediu nutritiv (Malman și Broitman), sau metoda Burri — inoculare cu striuri cu ansa calibrată pe mediu înclinat, nu au dat rezultate comparabile cu cea descrisă de noi în amănunt.

Metoda membranelor filtrante folosite cu excelente rezultate la analiza apei, nu este aplicabilă la lapte din cauza vîscozității sale (pentru filtrarea a 0,5 ml lapte printr-un filtru bacteriologic sînt necesare pînă la 10 minute).

### 4.5.3. Numărul probabil de bacterii coliforme

Determinarea acestui indicator își are originea la sfîrșitul secolului XIX și a pornit de la ideea că prezența unor germeni din grupul mare și încă nediferențiat al lui Bacterium coli, în produse alimentare ar arăta contaminarea sa cu materii fecale. Folosit pentru prima oară la cercetarea potabilității apei, a fost utilizat și pentru lapte de către Wyss în 1899. Dificultățile determinării germenilor care fac parte din acest grup, nu s-au rezolvat nici pînă în prezent, încît nu toți autorii sînt de acord în



Scanned with OKEN Scanner

privința genurilor taxonomice care cuprind sub această denumire : Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Agrobacterium, Pseudomonas-like etc.

Din această cauză, definiția coliformilor astăzi la noi este dată ca „bacili aerobi sau facultativ anaerobi, nesporulați, gram negativi, care la 37°C fermentează lactoza, cu producere de gaze".

Determinarea se face prin însămînțarea de cantități măsurate din proba de analizat și diluții decimale ale acesteia, în serii de cîte 3 eprubete cu tub de fermentare și mediu BBLV-bulion-bilă-lactoză-verde briliant, incubare la 37°C timp de 48 h, după care eprubetele pozitive (apariția de gaz în tubul Durham) se trec pentru confirmare pe mediul GEAM-geloză cu eozină și albastru de metilen, tip Levin, cu incubare 24 h la 37°C, unde se dezvoltă colonii caracteristice :

a) Colonii cu diametrul 4—6 mm, bombate, cu aspect mucoid, fără luciu metalic, de culoare roz, cu centru gri-brun ;

b) colonii cu diametrul 2—4 mm, ușor bombate, cu margini netede de culoare violet închis pînă la negru, cu luciu metalic pe suprafață.

Eprubetele care au fost găsite pozitive după caracterele de mai sus, se iau în considerare pentru stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme și anume, ultimele trei serii de diluții, cihar dacă una din aceste serii nu are toate eprubetele pozitive ; se obține o combinație de 3 cifre, cu care se obține numărul corespunzător combinației, care înmulțit cu factorul de diluție (egal cu numitorul în exprimare decimală al diluției celei mai mici luată în calcul) ceea ce ne dă numărul probabil de bacterii coliforme pe g sau ml produs.

### 4.5.4. Număr probabil de Esch. coli fecali

Pornind de la observația că tulpinile de Esch. coli provenind din intestinul omului sau animalului cresc la 44°C și chiar și la această temperatură eliberează indol din triptofan, s-a imaginat un test pentru numărul probabil al Esch. coli. Plecînd de la testul precedent, imediat după citirea rezultatelor la însămînțările pentru bacteriile coliforme, din fiecare eprubetă în care a avut loc producerea de gaz, se însămînțează cîte o ansă în eprubete cu mediu nutritiv BBLV și într-o eprubetă cu mediu pentru indol, preîncălzite la 44°C. Se face incubarea la baia de apă, sau la termostat la temperatura de 44°C ($\pm$ 0,5°C).

Se urmărește în fiecare eprubetă cu mediu BBLV producerea de gaz în cel puțin 1/10 din înălțimea tubului de fermentare. De asemenea, în eprubeta cu mediu pentru indol, se urmărește apariția indolului cu reactiv Erlich sau Kovacs, sau cu benzi special impregnate pentru decelarea indolului. Toate eprubetele în care s-au dezvoltat germeni producători de gaz și indol, se consideră pozitive pentru Esch. coli de tip fecal.

Pentru calcularea numărului probabil de Esch. coli fecal se aplică tabelele și calculele de la stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme.



Scanned with OKEN Scanner

## 4.5.5. Germeni patogeni

În lapte se pot găsi o mulțime de germeni patogeni. Cum mijloacele microbiologiei moderne ne permit izolarea și identificarea lor aproape în totalitate, totuși datorită volumului enorm de muncă și materiale, nu se încearcă determinarea lor exhaustivă. Astfel, s-a ajuns să fie cercetați cei mai obișnuiți, cei care oferă și informații indirecte despre posibila prezență a altora și care fac impropriu laptele și uneori și produsele sale pentru consum. Plecînd de la achizițiile cele mai moderne, s-au standardizat unele metodologii pentru a pune la îndemîna tuturor aceleași condiții de lucru, caz în care rezultatele devin grupabile. Această standardizare reprezintă totuși cerințele minime de diagnostic și nimic nu împiedică adîncirea, perfecționarea, amplificarea metodelor folosite, precum și extinderea cercetării asupra altor germeni care pot la un anumit moment să creeze noi probleme cu microorganismele din lapte.

### 4.5.5.1. Determinarea germenilor din genul Salamonella

Importanța determinării acestui gen de germeni este relevată, fie prin gravitatea infecțiilor transmise (febre tifice și paratifice, toxiinfecții alimentare), fie datorită ubicuității acestor microorganisme care sînt răspîndite mult în regnul animal și prin cele aproximativ 2 100 serotipuri înregistrate pînă în prezent ; reprezintă o arie de acoperire în natură foarte mare. Bineînțeles că puține sînt cele patogene pentru om, dar tot atît de adevărat este că noi serotipuri vin să se adauge mereu acestora.

Determinarea se face diferit după calitățile laptelui : laptele crud integral este supus preîmbogățirii, fie în apă peptonată tamponată, fie în bulion manită, iar laptele pasteurizat se trece direct în mediile de îmbogățire Müller Kauffmann sau mediu cu selenit. După preîmbogățire, laptele crud integral se trece și el în mediile de îmbogățire. Se repartizează cîte 125 ml sau 250 ml medii de îmbogățire. Se însămînțează 25 ml (g) sau 50 ml (g) din probă. Se incubează 6—18 h la 37°C. Din acestea se introduc cîte 0,5—1 ml în mediile de îmbogățire repartizate cîte 10 ml în eprubete 160/16.

În cazul laptelui pasteurizat se însămînțează cîte 25 ml în cele două medii de îmbogățire repartizate în baloane de cîte 200 ml. Pentru produsele grase (smîntînă, unt, brînzeturi grase), se adaugă la aceste medii cîte 6 ml soluție 10% de Tergitol 7, se agită pentru omogenizare, se însămînțează. Se incubează 24—48 h la 37°C. Pentru mediul Müller Kauffman se recomandă în paralel incubarea și la 43°C. Din mediile de îmbogățire se fac treceri pe medii solide cu precauția de a obține colonii izolate pentru identificare. Mediile folosite sînt : Istrati Meiteri geloză cu verde briliant, mediul Wilson Blair și ADCL.

În conformitate cu principiul, că șansa izolării unui germene crește cu numărul de plăci însămînțate, se pot folosi toate aceste medii deodată pentru o probă. Se incubează 24—48 h la 37°C.

Din aceste plăci cu medii solide, coloniile suspecte sînt studiate din punct de vedere cultural, biochimic (obligatoriu pe medii politrope-TSI,

MIU, MILF) și serologic. În cazul confirmării prin toate examinările de tulpini din genul Salmonella, acestea se trimit obligatoriu pentru confirmare și tipizare.

### 4.5.5.2. Stafilococii coagulazo-pozitivi

Intervenția deosebită a acestui germene în infectarea laptelui și a produselor sale, precum și legătura directă care există între numărul lor și fenomenele ce le generează, ne arată importanța determinării și a numărului lor.

Se execută un număr de diluții care să ducă la obținerea unui răspuns la numărare în conformitate cu tehnica descrisă la determinarea coliformilor. În acest fel se însămînțează cîte 3 eprubete cu medii de îmbogățire (mediu hiperclorurat lichid, mediul Giolitti Cantoni, cu precauția că în acesta din urmă se adaugă însămînțare 1,5—2 ml agar-agar 2% topit și răcit la 45°.

Aceste eprubete se termostatează la 37°C timp de 48 h după care se fac treceri pe mediile de confirmare (mediu hiperclorurat solid-Chapmann, mediul ETGPA-Baird Parker), cu mențiunea că pentru probele însămînțate pe mediul Giolitti Cantoni se vor face treceri numai din tuburile care s-au înnegrit sau prezintă un precipitat negru.

Plăcile cu medii selective se incubează 24 h la 37°C, se examinează și dacă nu sînt colonii tipice, specifice, se continuă incubarea încă 24 h la 37°C. Se consideră colonii tipice :

— pe mediul Chapmann, colonii de 1—2 mm, convexe, netede, rotunde, de culoare galben aurie și mediul din jurul coloniei virează în galben ;

— pe mediul ETGPA, colonii de 1—2 mm, negre strălucitoare, convexe, netede, rotunde, cu o margine albicioasă înconjurată de o zonă transparentă.

Pentru fiecare placă ce conține colonii tipice, se cercetează proba coagulazei asupra plasmei citrate umane sau de iepure, a unei culturi proaspete (maximum 24 h) în bulion a tulpinii de cercetat.

În eprubete de hemoliză peste 0,5 ml plasmă, se adaugă 0,5 ml cultură în bulion, se incubează la 37°C și se fac citiri la 1, 2, 3, 4, 5, 6 h — 24 h, urmărind apariția unui coagul în masa lichidiană în primele ore. O coagulare apărută la 24 h este discutabilă, se repetă de obicei.

### 4.5.5.3. Bacillus cereus

Specia aceasta cuprinde germeni de formă bacilară, gram pozitivi, sporulați mobili, aerobi și facultativ anaerobi, necapsulați, care nu fermentează manită și produc lecitinoză beta, rezistent la penicilină și lizozim.

Se poate face o numărare directă a lor prin etalarea unei cantități cunoscute (0,1 ml) din produsul de cercetat sau din diluțiile acestuia, pe mediul de izolare agar, manită, gălbenuș de ou, polimixină, MYP — după



Scanned with OKEN Scanner

Mossel, sau pe geloză sînge ; se incubează la temperatura de 37°C timp de 24 h sau 48 h, se numără coloniile tipice dezvoltate și se raportează la g sau ml produs analizat.

Se poate face, de asemenea, o determinare a numărului probabil de germeni din specia Bacillus cereus, după metoda folosită la bacteriile coliforme. Din produsul omogenizat și din diluțiile sale se însămînțează în mediul de îmbogățire, bulion nutritiv cu emulsie de gălbenuș de ou și polimixină B, se incubează la 37°C timp de 24—48 h și cu treceri pe mediul de izolare MYP și pe agar sînge, incubate la 37°C timp de 24 h. Se stabilește numărul probabil de Bacillus cereus prin examinarea coloniilor caracteristice (colonii mari, roz-închis, cu o zonă de precipitare a gălbenușului) și după formula cunoscută se exprimă numărul lor la g sau ml produs.

### 4.5.5.4. Bacterii sporulate anaerobe

Determinarea acestor germeni are mare importanță mai ales pentru laptele folosit ca materie primă la fabricarea brînzeturilor, întrucît din germenii anaerobi fac parte microorganismele care deteriorează calitățile brînzeturilor. Pentru aceasta se introduc în 5 eprubete cîte 2 ml parafină, sterilizate la 120°C timp de 20 minute. În acestea se repartizează cu o pipetă cîte 5 ml din proba de lapte de cercetat și se introduc în baia de apă, reglată la 80°C. Separat, într-o altă eprubetă în baia cu apă, avem un termometru introdus în laptele de cercetat și după atingerea în această eprubetă a temperaturii de 80°C se țin toate eprubetele timp de 10 minute. Se realizează astfel, pe de o parte, distrugerea tuturor formelor vegetative ale microorganismelor, pe de altă parte, parafina topindu-se și ridicîndu-se la suprafață realizează condițiile de anaerobioză. După inactivarea aceasta, eprubetele se răcesc brusc în apă rece, după care se incubează 48 h la 37°C și se examinează eprubetele, observîndu-se producerea de gaze care împing stratul de parafină solidă.

Dacă două sau mai multe eprubete sînt pozitive, laptele este considerat nesatisfăcător.

### 4.5.5.5. Determinarea numărului probabil de Clostridium perfringens

Acest germene, cel mai răspîndit dintre toate microorganismele care pot provoca infecții la om, are o răspîndire universală, se găsește în orice mediu, sol, apă, aer, pe orice suprafață, în orice aliment care nu a fost sterilizat. La om și la animale se găsește pe piele, mucoase și 100% în conținutul intestinal. De aici rezultă importanța decelării sale și a determinării numărului probabil în lapte crud sau pasteurizat, ca și în produsele sale de orice fel.

Din proba de analizat, ca și din diluțiile sale, se inoculează cîte 1 ml în cîte 3 eprubete care conțin unul din mediile de îmbogățire regenerate (bulion VF cu acid tioglicolic și albastru de metilen sau mediul bulion



Scanned with OKEN Scanner

glucozat cu ficat sau carne fiartă). Din eprubetele inoculate în care s-au dezvoltat microbi cu formare de gaze și care la examenul microscopic apar ca bacili gram pozitivi, se reînsămînțează cîte o ansă, astfel :

— într-o eprubetă cu unul din cele două medii de izolare (mediul DRCA-agar, glucoză, amidon, sulfit, cisteină, neomicină și polimixină B), mediul agar, triptonă, sulfit de sodiu, polimixină și neomicină Marshall ;

— într-o cutie Pétri cu mediul de identificare Nagler ;

— într-o eprubetă cu mediul de identificare lapte turnesolat.

Eprubetele cu mediul de identificare și cele cu mediul de izolare, se incubează la termostat sau la baia de apă la temperatura de 46°C timp de 24 h.

În mediul de identificare Nagler se incubează în condiții de anaerobioză (cu amestec reducător sau în termostate speciale).

Pe geloza glucozată cu gălbenuș de ou se produce reacția Nagler : în colonii se produce o lecitinază, care difuzînd în jurul coloniilor descompune lecito-vitelina din ou într-un diglicerid și fosforil-cholină, avînd drept rezultat producerea unui precipitat și opacifierea mediului. Dacă o jumătate a plăcii a fost acoperită cu ser antiperfringens și însămînțarea s-a făcut în striuri perpendiculare pe linia de demarcație, reacția apare numai în jumătatea fără ser.

Fiind un puternic sulfitoreducător, înnegrește rapid mediile care conțin sulfit de sodiu și un compus feric, în așa fel încît prezența unor colonii negre în mediile de izolare certifică coroborate cu celelalte semne, prezența lui Clostridium perfringens.

În laptele turnesolat, perzintă un aspect foarte caracteristic, numit cheag alveolar.

Laptele este inițial redus, apoi fermentat, virînd spre roșu, coagulat, cheagul este lipit de un perete și sfîșiat de gaze, se alege zer limpede, totul surmontat de alt cheag buretos și roșu. Pe baza diluțiilor și a numărului de eprubete în care s-a constatat prezența germenului, se stabilește numărul probabil pe gram sau ml de produs, după calculul numărului probabil de bacterii coliforme.

### 4.5.5.6. **Determinarea germenilor din genul Mycobacterium**

Întrucît importanța prezenței Mycobacterium bovis în lapte și infecția umană este controversată, deși a fost dovedită, cercetarea germenului în lapte este dificilă, mult mai ușoară fiind descoperirea, tratarea sau îndepărtarea animalelor bolnave. În țările în care campaniile antituberculoase la animale au fost bine conduse boala a fost practic eradicată.

Pentru decelarea Mycobacterium tuberculosis în lapte sau produsele sale, se folosesc metode directe bacterioscopice, însămînțări pe medii speciale și inoculări la animale.

Cele mai des utilizate sînt metodele de bacterioscopie directă, care se aplică laptelui crud, pasteurizat sau produselor sale. Pentru lapte, se centrifughează la 3 000 ture timp de 30 minute și din sedimentul astfel obținut se întind frotiuri pe lame care se degresează cu eter sau xilol și se colorează cu metoda Ziehl-Nielsen, precum și coloratia cu florocrom pentru microscopia fluorescentă.



Scanned with OKEN Scanner

Unii autori au încercat metode specifice pentru lapte, astfel, W. Buss propune ca într-un cilindru gradat de 50 ml se pun 20 ml dintr-un amestec de acid acetic 0,01 ml și alcool de 37°C (la 38 ml etanol de 96° se adaugă 62 ml apă distilată), peste care se toarnă 20 ml lapte. După un repaus de 5—10 minute se recoltează stratul de la suprafață cu ansa și se întind frotiuri care se colorează ca mai sus.

Metoda Fernier și Thomas, — se amestecă în părți egale lapte și o soluție mixtă formată din alcool etilic de 80° (100 ml) și amoniac cu 22° Be (100 ml). Se realizează astfel o reducere a greutății specifice a amestecului, care ușurează sedimentarea lui Mycobacterium tuberculosis în timpul centrifugării, iar cantitatea de sediment se reduce. Se realizează o separare bună a smîntînei de o cantitate mică de sediment, care după îndepărtarea smîntînei și lichidului se examinează prin frotiuri colorate.

Însămînțarea pe medii de cultură (Löwenstein-Jensen) ridică probleme deosebite datorită marii întîrzieri a creșterii germenilor, de la 30—60 zile la temperatura de 37°C. Singura problemă este obținerea inoculului pentru însămînțare și a inactivării sale față de alți germeni, de aceea se execută centrifugarea și apoi tratarea sedimentului amestecat cu straturi de smîntînă cu acid sulfuric 8% sau acid clorhidric 12—15%.

Cea mai sensibilă metodă și cu rezultatele cele mai bune, este inocularea la animale. Se execută inocularea pe partea internă a plicii inghinale drepte sau intramuscular, la cîte doi cobai în greutate de 300—400 g, clinic sănătoși, proveniți dintr-o crescătorie indemnă de boli infecțioase și care au reacția la tuberculină negativă.

Amestecul sediment-smîntînă, obținut prin unul din metodele de mai sus, tratate și agitate cu acid sulfuric 5% timp de 10 minute, neutralizat cu hidroxid de sodiu N/10 pînă la neutralizare, se inoculează animalelor ca mai sus, pentru prevenirea infectării cu alți germeni.

Animalele se urmăresc clinic 90 de zile asigurîndu-le condiții optime de contenție, hrană și îngrijire.

În fiecare săptămînă se cîntăresc și examinează clinic, local și general, pentru că infecția tuberculoasă la cobai se traduce prin scăderea în greutate, producerea unui nodul care se ulcerează (șancru), la locul inoculării și adenopatie satelită.

Începînd cu săptămîna a 5-a, se practică reacția la tuberculină, cu tuberculină brută diluată 1/10.

Animalele cu reacția la tuberculină pozitivă, cele cu semne manifeste de tuberculoză, se sacrifică, se autopsiază și se cercetează prezența germenului Mycobacterium tuberculosis.

### 4.5.5.7. **Brucella**

Bruceloza este exemplul tipic de zoonoză, brucelele fiind bine vehiculate prin lapte, de la care se pot contamina oamenii.

Odată cu apariția pasteurizării, numărul de transmisii prin lapte a scăzut consilerabil, cu toate acestea depistarea brucellelor merită încă interesul nostru.

Ca importanță epidemiologică, sursele principale de infecție sînt în ordine descrescîndă, ovinele, caprinele, taurinele și suinele.



Scanned with OKEN Scanner

Supravegherea, izolarea, tratarea animalelor bolnave duce la ruperea căii de transmitere a bolii la om.

Se face un diagnostic din examen bacterioscopic direct și imunofluorescență, dar datorită densității mici a germenilor sînt de mică valoare. Se face o colorație diferențială după metoda Kšter :

— frotiu uscat la cald ;
— colorație 1 minut cu amestec proaspăt (din 2 părți soluție apoasă saturată din safranină și 5 părți hidroxid de potasiu 1 mol/l.
— spălat cu apă de robinet ;
— decolorare de 2 ori cu acid sulfuric 0,1% între 10—20 secunde ;
— spălare cu apă ;
— recolorare cu albastru de metilen fenicat 1% — 1 minut ;
— brucelele apar roșu-oranj pe fond albastru.

Metodele de cultură sînt foarte laborioase, sînt medii lichide la care se adaugă ser inactivat de bou și din mediile lichide se fac treceri repetate pe medii solide. La mediile solide se adaugă bacitracină, cicloheximidă, polimixină B și cristal violet.

Însămînțarea mediilor se face din sedimentul și smîntîna obținută prin centrifugarea laptelui.

Inocularea cobaiului se recomandă totdeauna la produsele paucibacilare și se face subcutanat sau intraperitoneal la 2—3 cobai normali, din sedimentul și smîntîna obținute prin centrifugare. Se urmăresc serologic prin RFC și aglutinare, începînd de la 2 săptămîni, iar după 6 săptămîni, sînt sacrificați pentru examen bacteriologic și anatomopatologic. Un răspuns serologic cu aglutinare la titru minim 1 : 20 și RFC pozitiv este considerat semnificativ, ca și o reacție alergică la brucelină cu diametrul minim de 0,5 cm.

Pentru depistarea laptelui infectat cu brucellă se execută reacția inelară în care 1 ml de lapte bine omogenizat, pus într-o eprubetă de hemoliză se amestecă cu o picătură de antigen colorat, special preparat, apoi se lasă la termostat, examinîndu-se după 15—40 minute, sau la temperatura camerei după aproximativ 6 ore.

Reacția este pozitivă, cînd apare un inel colorat la suprafață, iar straturile inferioare sînt decolorate pentru că bacteriile aglutinate de antigen aderă la globulele de grăsime ridicîndu-se la suprafață.

### 4.5.5.8. Determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri

În lapte, ca și în produsele sale, drojdiile și mucegaiurile, pot interveni cu efecte nedorite, fie asupra calității directe a produsului, fie a posibilității transmiterii unor specii patogene sau elaboratoare de alfatoxine. De aceea, trebuiesc numărate pentru menținerea la un nivel foarte mic a prezenței lor în lapte și unele din produsele sale. Se însămînțează cîte 1 ml din produs și diluțiile sale pe cîte 2 plăci cu mediu solid și incubare la temperatura camerei (20—25°C), la întuneric timp de 5 zile. Se execută numărarea coloniilor cu ochiul liber, luîndu-se în considerare numai plăcile care conțin între 10—100 colonii. Se calcu-

lează media aritmetică a numărului de colonii din cutiile Pétri ținînd cont și de factorul de diluție.

Rezultatele se exprimă ca număr de drojdii și mucegaiuri pe ml sau g.

### 4.5.6. Alte examene complementare

Pentru cercetarea cît mai completă a laptelui și produselor sale se execută unele examinări complementare, care ne dau indirect informații asupra unor calități sau defecte microbiologice.

#### 4.5.6.1. Identificarea laptelui mastitic (Stas 6349/8-80)

Se face prin punerea în evidență a conținutului în leucocite și se adresează laptelui crud integral.

Peste 2 ml probă de lapte se adaugă 2 ml reactiv CMT (California Mastitis Test), se agită și la 10 secunde se citește apariția unui gel care nu dispare prin agitare — text pozitiv.

#### 4.5.6.2. Controlul eficienței pasteurizării

Plecînd de la premiza că pasteurizarea distruge aproape total enzimele din lapte, s-au imaginat teste de cercetare și determinarea cantitativă a fosfatazei alcaline sau/și a peroxidazei efectuate în laboratoarele de chimie.

**PROBA REDUCTAZEI PENTRU LAPTE** (Stas 6349/2-80)

Datorită acțiunii oxido-reducătoare a microorganismelor existente în laptele crud integral, o soluție de albastru de metilen sau de resazurină sînt reduse în timp invers proporțional cu numărul de microorganisme din el.

Într-o eprubetă sterilă se introduc 1 ml soluție de albastru de metilen și 10 ml lapte crud integral, încălzit la 38—40°C. După agitare eprubeta se introduce în baie sau într-un recipient cu apă încălzită în termostat la 37°C. În raport cu intervalul în care a apărut decolorarea se face aprecierea calității microbiologice a laptelui :

— sub 20 minute — total nesatisfăcător ;
— pînă la 2 h — nesatisfăcător ;
— între 2 h și 5 h și 30 minute — satisfăcător ;
— peste 5 h și 30 minute — bună.

Pentru resazurină se introduce într-o eprubetă sterilă 1 ml din soluția de lucru, peste care se adaugă 10 ml de lapte crud integral. Se agită,



Scanned with OKEN Scanner

se introduce, fie în baie de apă, fie în recipient cu apă caldă la termostat la 37°C. După o oră se scoate proba, se agită pentru uniformizare, se examinează nuanța de colorare ; se evită efectuarea ca și citirea analizei la lumina solară directă, pentru că provoacă modificări rapide de culoare. După nuanța de culoare, se obțin următoarele calități :

— alb — total nesatisfăcător ;
— roz, roz pal — nesatisfăcător ;
— violet albăstrui, violet roșu — satisfăcător ;
— albăstrui oțel, albăstrui palid — bună.

### 4.5.6.3. Determinarea factorilor inhibitori din lapte

Întrucît în tehnologiile moderne de stimulare a creșterii la animale s-a preconizat administrarea unor antibiotice sau chimioterapice și cum o bună parte din acestea trec în lapte, pentru împiedicarea apariției unor efecte nedorite la consumatorii umani, se cercetează prezența unor factori inhibitori din laptele crud integral. Metoda bazată pe capacitatea de inhibare a unui germen test, de către factorii inhibitori, eventual prezenți, folosește tehnica difuzimetrică în mediul solid cu germene test (Bacillus Stearothermophilus sau Bacillus subtilis ATCC 6633).

Cerințele microbiologice pentru lapte și produse lactate sînt cele prevăzute în Ordinul Ministerului Sănătății 184/1972 — revizuit :

— *pentru lapte pasteurizat :*

| | |
|---|---|
| NTG | 300 000/ml |
| Bacterii coliforme | 10/ml |

— *pentru lapte praf (integral, degresat etc.) :*

| | |
|---|---|
| NTG | 100 000/g |
| Bacterii coliforme | 10/g |
| Esch. coli | 1/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 1/g |
| Bacillus cereus | 10/g |

— *pentru lapte praf reconstituit* (10 g cu 90 ml Ser Fiziologic) :

| | |
|---|---|
| NTG | 10 000/ml |
| Bacterii coliforme | 1/ml |
| Esch. coli | abs./ml |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | abs./ml |
| Bacillus cereus | 1/ml |

— *pentru lapte praf, produse lactate și produse dietetice pentru copii mici :*

| | |
|---|---|
| NTG | 50 000/g |
| Bacterii coliforme | 10/g |
| Esch. coli | 1/g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 1/g |
| Bacillus cereus | 10/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | 100/g |
| Drojdii și mucegaiuri | 10/g |

— *pentru iaurt și produse lactate acide sau fermentate (lapte bătut, Sana, Kefir etc.)*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 10/ml |
| Esch. coli | abs./ml |
| Salmonella | abs./50/ml |

— *pentru smîntîna folosită în alimentație*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 100/ml |
| Esch. coli | 10/ml |
| Salmonella | abs./50/ml |

— *pentru smîntînă dulce folosită la frișcă, frișcă bătută*:

| | |
|---|---|
| NTG | 100 000/g |
| Bacterii coliforme | 10/g |
| Esch. coli | 1/g |
| Salmonella | abs./50/g |
| Stafilococ coagulază + | abs./g |

— *pentru brînză de vaci*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 1 000/g |
| Esch. coli | 100/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 10/g |

— *pentru brînză telemea proaspătă, caș proaspăt*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 1 000/g |
| Esch. coli | 100/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 100/g |
| Drojdii și mucegaiuri | 100/g |

— *pentru brînză telemea maturată, brînzeturi fermentate (cu sau fără culturi selecționate, cu pastă tare sau moale)*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 10/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 100/g |

— *pentru brînzeturi frămîntate*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 1 000/g |
| Esch. coli | 100/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 1 000/g |
| Drojdii și mucegaiuri | 2 000/g |

— *pentru brînzeturi topite*:

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 1/g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | 10/g |

— *pentru unt :*

| | |
|---|---|
| Bacterii coliforme | 25/g |
| Salmonella | abs./50 g |
| Stafilococ coagulază + | abs./g |
| Drojdii și mucegaiuri | 2 000/g |

— *pentru înghețată :*

| | |
|---|---|
| NTG | 300 000/g |
| Bacterii coliforme | 25/g |
| Esch. coli | 1/g |
| Salmonella | abs./50 g |

## 4.6. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A CĂRNII ȘI PEȘTELUI

Acest examen reprezintă informațiile microbiologice asupra calității cărnii proaspete sau produselor sale, fie că infectarea eventual descoperită aparține materiilor prime, fie proceselor tehnologice de preparare. Deși pentru carnea proaspătă examinarea microbiologică aduce informațiile mult după intrarea ei în consum, sau procesul de producție, astăzi nu se mai poate accepta ca unii indicatori microbiologici să nu facă parte din controlul obligatoriu al cărnii și preparatelor.

Metodele de analiză bacteriologică prezentate mai jos sînt aplicabile la :

— carnea svîntată, refrigerată sau congelată ;
— carne tocată și semipreparate din carne tocată ;
— preparate din carne sărate și afumate ;
— mezeluri (prospături, salamuri semiafumate) ;
— salamuri crude, uscate ;
— produse de carne gata preparate care se consumă reci (piftii, aspicuri, pateuri) ;
— mîncăruri gătite calde ;
— mîncăruri gătite congelate ;
— semipreparate tip gospodina ;
— gelatină alimentară.

Analiza bacteriologică trebuie efectuată în laboratoare autorizate, specializate, bine dotate cu personal, aparatură, medii de cultură, reactivi, alte materiale.

### 4.6.1. Recoltarea probelor

Ca în orice altă activitate microbiologică, recoltarea trebuie făcută în condiții care să evite contaminarea produsului de cercetat : instrumente și recipiente curate și sterile, hîrtie pergaminată curată, pungi nefolosite



Scanned with OKEN Scanner

din material plastic. Personalul care face recoltarea trebuie să fie bine instruit, tot în scopul evitării contaminării probelor.

În raport cu sortimentul de analizat și pentru controlul unor produse aparent corespunzătoare, cantitatea minimă a probelor necesare este următoarea :

| | |
|---|---|
| — carne, organe, subproduse | — 150 g |
| — carne tocată | — 100 g |
| — preparate carne (salamuri, cîrnați) | — 150 g |
| — extract de carne supe | — un ambalaj |
| — mîncăruri calde și reci produse „Gospodina“ | — o porție sau un ambalaj |
| — gelatină alimentară | — o porție sau un ambalaj |

Carnea proaspătă recoltată va consta dintr-un cub de țesut muscular pentru a putea executa analiza straturilor profunde. De la animale suspecte de boală se recoltează țesut muscular, un os lung, organe sau părți de organe suspecte sau indemne.

Este evident că în asemenea situații, cantitatea este mai mare. Probele din preparate din membrană se recoltează din mijlocul batonului, iar din preparate fără membrană se recoltează atît din stratul superficial, cît și din cel profund, în bucăți unitare. Ori de cîte ori sînt necesare investigații suplimentare, cantitățile vor fi adecvate scopului urmărit. În orice caz, în mod obligatoriu, probele pentru examenul microbiologic vor fi recoltate separat de oricare alte probe.

Probele trebuiesc transportate la laborator în maximum 6 ore de la recoltare și *la temperatura la care a fost păstrat produsul.*

În laborator se vor lua măsurile pentru prevenirea contaminării accidentale, toate operațiile executîndu-se aseptic. Probele trebuiesc introduse imediat în lucru, cu excepția produselor congelate care se vor păstra pentru decongelare la temperatura +4—+5°C timp de cca 12 h. Probele de carne sau produsele se cîntăresc în mod steril, în cantitatea solicitată, în raport cu specia microbiană ce trebuie determinată. Pentru efectuarea diluțiilor se folosește serul fiziologic peptonat ca diluant, pentru majorarea unei cantități de probă în mojar steril cu nisip steril.

### 4.6.2. **Bacterioscopia**

Bacterioscopia stabilește gradul eventual de contaminare superficială și profundă a cărnii prin determinarea numărului de germeni pe un cîmp microscopic. Se folosește metoda amprentei, atît de la suprafața cărnii, cît și de pe o secțiune profundă, realizată aseptic în proba de cercetat. Pentru probele grase se toarnă toluen sau xilol și apoi spălare cu alcool etilic 96% pentru degresare, după uscarea și fixarea frotiurilor, se numără germenii de pe 10 cîmpuri microscopice exprimîndu-se rezultatul prin media aritmetică a lor.



Scanned with OKEN Scanner

### 4.6.3. Determinarea numărului total de germeni

Determinarea numărului total de germeni aerobi mezofili stabilește încărcătura microbiană a probei de cercetat prin metoda încorporării în mediul nutritiv solid și incubare în aerobioză. Din diluțiile efectuate se însămînțează 1 ml pentru fiecare diluție și se toarnă 15 ml mediu agar nutritiv topit și răcit la 45°C. Se omogenizează prin mișcări de rotație, se incubează la 30°C timp de 72 h sau 37°C timp de 48 h. Se face numărarea coloniilor, fie cu ochiul liber, fie mai bine cu ajutorul lupei sau cu ajutorul aparatelor de numărat, luîndu-se în considerare numai acele plăci care au între 30 și 300 colonii. Se face media aritmetică a coloniilor din aceeași diluție, se înmulțește cu factorul de diluție și se face apoi media aritmetică a diluțiilor luate în calcul. Rezultatul se exprimă prin NTG aerobi mezofili/g de produs. NTG este un indicator important pentru carnea proaspătă, arătîndu-ne gradul de contaminare al cărnii în profunzime și implicit gradul de alterare al acesteia.

### 4.6.4. Determinarea bacteriilor coliforme

Determinarea bacteriilor coliforme reprezintă cercetarea grupului mare de germeni care fermentează cu gaz lactoza, la 37°C și care în majoritate sînt germeni enterici. Prezența lor constituie o prezumție de contaminare fecală a cărnii sau produselor sale și în funcție de numărul probabil al bacteriilor coliforme se apreciază calitatea produsului analizat.

Se efectuează diluții în așa fel încît să avem cantități măsurate — 1 g ; 0,1 g ; 0,01 g ; 0,001 g — care se însămînțează în tuburi cu mediu BBLV. După o incubare de 48 h la 37°C se consideră pozitive pentru bacterii coliforme, eprubetele în care a avut loc degajare de gaze pe cel puțin o zecime din înălțimea tubului de fermentație. Pentru confirmare, din aceste tuburi se fac treceri pe mediul GEAM (Levine). Dacă apar colonii cu aspect mucoid de culoare roz, cu centrul gri-brun, sau colonii bombate cu margini netede de culoare violet închis pînă la negru, cu sau fără luciu metalic, se confirmă prezența bacteriilor coliforme, stabilindu-se titrul sau numărul probabil (tabel nr. XXX) :

*Tabel nr. XXX*

| *Cantitatea de probă însămînțată în eprubetă g* | *Diluția* | *Interpretare* |
|---|---|---|
| 1 | 1/1 | (—) negativ = bacterii coliforme absente/g sau la 1 g<br>(+) pozitiv și 0,1 negativ = bacterii coliforme pînă la 10/g (absente/0,1 g) |
| 0,1 | 1/10 | (+) pozitiv și 0,01 negativ = bacterii coliforme pînă la 100/g (absente/0,01 g) |
| 0,01 | 1/100 | (+) pozitiv și 0,001 negativ = bacterii coliforme pînă la 1 000/g (absente/0,001 g) |
| 0,001 | 1/1 000 | (+) pozitiv = bacterii coliforme peste 1 000/g |



Scanned with OKEN Scanner

### 4.6.5. Determinarea Escherichiei coli

Determinarea Escherichiei coli reprezintă cercetarea bacteriei coli determinată ca mai sus, cu incubarea la 44°C pe mediul BBLV cu tub de fermentare. Se însămînțează cîte 2—3 colonii caracteristice din fiecare diluție și se cercetează creșterea pe mediul BBLV cu fermentarea lactozei de gaz la temperatura de 44°C, precum și pe medii cu triptonă (bulion peptonat cu o peptonă bogată în triptofan), producerea iodului în aceleași condiții de incubare.

În acest fel se confirmă tulpinile de Escherichia coli tip fecal, care pot fi cercetate și pentru eventuala lor aparență la grupurile enteropatogene, enteroinvazive sau enterotoxigene.

### 4.6.6. Determinarea germenilor din genul Proteus

Determinarea germenilor din genul Proteus face parte din aceeași încercare de a arăta prin unii indicatori sanitari, eventuala contaminare cu floră intestinală sau floră de putrefacție. Determinarea prezenței acestor germeni se bazează pe proprietatea genului de a migra pe mediile de cultură (fenomen de cățărare pe geloză înclinată). Se însămînțează în lichidul de condensare al unor tuburi de geloză înclinată proaspătă, a unei picături din diluția 1/1 și 1/10 a produsului de cercetat. Apariția fenomenului de cățărare este caracteristică genului Proteus (negativă pentru genurile Providenci și Morganella).

### 4.6.7. Determinarea numărului de Bacillus cereus

Această determinare se face după metoda folosită la lapte și produsele lactate. Cercetarea acestui bacil are drept scop să ofere un indicator despre prezența în produsul de analizat a germenilor aerobi sporulați. Deci, indirect ni se dau informații asupra prelucrării igienice a produsului sau a insuficienței pregătrii termice a lui. Se însămînțează din produsul omogenizat și din diluțiile acestuia cîte 0,1 ml pe suprafața unei plăci Pétri cu geloză sînge și a unei cutii Pétri cu geloză manită-gălbenuș de ou (MYP-MOSSEL). Pentru determinarea numai a sporilor, omogenizatul se menține 45 minute la 65°C și apoi se fac diluții care se însămînțează ca mai sus. Plăcile se incubează 24 ore la 37°C, se examinează coloniile caracteristice, eventual se fac studii biochimice pentru identificarea bacilului cereus. Se determină media coloniilor de bacili cereus din aceeași diluție, se face înmulțirea cu factorul de diluție, se face media aritmetică a diluțiilor și se exprimă rezultatul în număr de bacili cereus (spori)/g.

### 4.6.8. Determinarea Clostridiilor sulfito-reducătoare

Prin această determinare se arată prezența în produsul de analizat a germenilor din genul Clostridium, genul cel mai răspîndit în lumea care ne înconjoară. Confirmarea prezenței germenului Clostridium perfringens



Scanned with OKEN Scanner

ne dă indicații asupra gradului de contaminare și de alterare al produsului de analizat. Pentru determinarea prezenței, Clostridiile sulfito-reducătoare se însămînțează cîte 1 ml din produsul omogenizat în 5 eprubete cu mediu VF (regenerat 10 minute la 100°C) și cîte 1 ml din diluțiile sale, efectuate în funcție de gradul de infectare (de regulă $10^{-3}$). Înainte de însămînțare, produsul omogenizat se încălzește la baia de apă și se menține la temperatura de 70°C timp de 10 minute, în acest fel distrugîndu-se formele vegetative ale microorganismelor. Mediile se incubează la 37°C timp de 1—3 zile, în funcție de apariția semnelor de dezvoltare microbiană. Din tuburile cu turbiditate se face examen bacterioscopic și dacă se constată prezența unor bacili gram pozitivi, se fac treceri pe mediul DRCA sau pe mediul cu agar-sulfit de sodiu și citrat feric.

După incubare, 5 zile la 37°C, creșterea unor colonii care înnegresc mediile de cultură indică prezența bacteriilor sulfitoreducătoare. Pentru aprecierea numărului probabil, se aplică modul de interpretare prezentat la bacteriile coliforme.

## 4.6.9. Determinarea germenilor patogeni

### 4.6.9.1. Determinarea prezenței bacteriilor din genul Salmonella

Așa cum am mai arătat, Salomonellele fiind larg răspîndite la om și animale, posibilitățile de infectare endogenă sau exogenă ale cărnii și produselor sale sînt foarte mari și știindu-se că veriga alimentară reprezintă calea esențială de pătrundere la om, detectarea lor are o importanță deosebită. Lipsa specificității de gazdă pentru majoritatea serotipurilor și rezistența în mediul extern, potențează verigile și factorii responsabili de circulația Salmonellei în natură. Cercetarea prezenței Salmonellelor are o metodologie diferită în funcție de produsul de analizat.

În carnea proaspătă și refrigerată, se însămînțează cîte 25 ml în 100 ml mediu de îmbogățire selenit cistină sau/și mediul selenit-acid de sodiu și 25 g în 100 ml mediu Müller-Kauffmann. În cazul probelor bogate în grăsimi, se adaugă 6 ml soluție de tergitol 10%. Mediile însămînțate se incubează la 37°C diferit Müller-Kauffmann — 24 h, iar mediile cu selenit 24 h sau 48 h. Din mediile de îmbogățire se fac treceri pe mediile selective, geloză verde brillant și mediul Istrati-Meitert care se incubează la 37°C 24 ore, sau/și pe mediul ADCL și Wilson-Blair incubate 48 h la 37°C. Este preferabil pentru creșterea eficienței examinărilor pentru Salmonella, să se folosească cît mai multe din mediile prezentate, precum și o altă serie de medii de îmbogățire, care să fie incubate la temperatura de 42°C.

Pentru detectarea Salmonellelor în carnea congelată, diferite semipreparate de carne proaspătă, de carne sărată și/sau afumată, preparate de carne care au suferit o prelucrare termică etc., se începe cu o preîmbogățire în bulion manită, bulion nutritiv sau apă peptonată tamponată. Se însămînțează cîte 25 g în 100 ml din carnea tocată, semipreparate din carne tocată, semipreparate tip „Gospodina", gelatină alimentară, sau



Scanned with OKEN Scanner

50 g în 200 ml mediu din preparate de carne sărate și/sau afumate, mezeluri, salamuri crude uscate, produse de carne mixte sau simple, gata pregătite care se consumă reci, mîncăruri gătite calde și mîncăruri congelate etc. Mediile însămînțate se incubează 24 h la 37°C, după care se fac treceri pe mediile de îmbogățire turnate în tuburi 160/16. Mai departe, după incubare se fac treceri pe mediile selective. Din mediile selective, coloniile suspecte se studiază pentru confirmarea prezenței germenilor din genul Salmonella, în conformitate cu tehnica microbiologică de uz curent.

### 4.6.9.2. Determinarea numărului de stafilococi coagulazo-pozitivi

Cercetarea cantitativă a stafilococului coagulazo-pozitiv este foarte importantă pentru că numărul lor crescut peste anumite limite face impropriu consumul de carne și produse din carne. Foarte important la toate produsele, el are un caracter determinativ în preparatele care se servesc reci (salate, aspicuri, piftii, prospături), unde lipsa unei prelucrări termice poate duce la toxiinfecții alimentare, dacă produsele au fost infectate cu cantități semnificative de stafilococi patogeni.

Plecîndu-se de la principiul numărării de bacterii coliforme, se însămînțează cîte 1 ml din produsul omogenizat ca și din diluțiile sale în serii cîte 3 eprubete cu mediu de îmbogățire hiperclorurat lichid, se incubează 48 h la 37°C ± 0,5 și se fac sub culturi de confirmare pe mediile de cultură solide ETGPA, GGT sau hiperclorurat solid Chapmann, apreciindu-se coloniile tipice și numărul lor.

Se poate face, de asemenea, etalarea a 0,1 ml din produsul omogenizat și diluțiile sale direct pe mediile solide de mai sus. Se incubează la 37°C ± 0,5 și se face o primă citire la 24 h apoi și la 48 h, căutîndu-se colonii caracteristice :

— pe mediul ETGPA colonii negre, lucitoare, convexe, de 1—1,5 mm cu margine albă, înconjurate de o zonă clară de 2—5 mm ;

— pe mediul GGT, coloniile sînt de culoare neagră, convexe, rotunde, lucitoare sau mate, de 1—2 mm, înconjurate de o zonă opacă, gălbuie, cu precipitat granular, cu peste 1 mm diametru ;

— pe mediul Chapmann, colonii rotunde, gălbui-aurii, de 1—2 mm cu virarea mediului în galben (fermentarea manitei).

Coloniile caracteristice se verifică microscopic, prin examenul catalazei, fosfatazei și coagulazei. Dacă nu sînt colonii caracteristice la 24 h, se face și o examinare după 48 h.

Se numără coloniile caracteristice în plăcile Pétri în care au crescut între 10—300 asemenea colonii. Ținînd cont de cantitatea însămînțată în plăci și diluții, se face calculul obținîndu-se numărul prezumtiv al stafilococilor.

Pentru a determina numărul de stafilococi coagulazo-pozitivi se procedează astfel :

— se controlează cu testul coagulazei 5 colonii caracteristice din plăcile pe care sînt pînă la 50 colonii suspecte ;



Scanned with OKEN Scanner

— se controlează 10 colonii caracteristice dacă pe plăci sînt peste 50 colonii suspecte.

Factorul de pozitivitate obținut, aplicat numărului prezumtiv de stafilococi/g ne dă numărul de stafilococi coagulazo-pozitivi/g.

## 4.6.10. Analiza microbiologică a cărnii conservate și a preparatelor din carne

După cum am văzut, în diferitele faze și tehnologii de conservare se încearcă obținerea unor cifre cît mai mici de microorganisme în produse. Aceasta duce la mărirea duratei de conservare a produsului, împiedicînd dezvoltarea florei proprii, ca și contaminarea accidentală care să ducă la alterare.

Din aceasta decurge faptul că, NTG nu mai perzintă importanță decît pentru produsele din carne (mixte sau simple), gata pregătite, care se consumă reci — piftii, aspicuri, pateuri din carne și organe, salate etc. —, mîncăruri gătite, mîncăruri congelate. Toate celelalte au ca cerință microbiologică imperioasă numai prezența germenilor patogeni și aceștia se cercetează prin indicatori sanitari care pot arăta posibilitatea infectării produsului, și prin metode directe pentru unii din ei.

*Indicatori sanitari.* Așa cum am arătat, cercetarea lor, aprecierea numerică coroborată, ne dă informații prețioase, relativ rapide, asupra contaminării produsului cercetat.

Numărul total al germenilor (NGT) se cercetează numai la produsele enumerate mai sus și se execută la fel ca la punctul 4.6.3. Determinarea bacilului *Proteus* se face ca la punctul 4.6.6.

*Determinarea Clostridiilor sulfito-reducătoare* se face ca la punctul 4.6.8.

*Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme* se face ca la punctul 4.6.4.

*Determinarea numărului de Escherichia coli fecal* se face ca la punctul 4.6.5.

*Determinarea drojdiilor și mucegaiurilor* — vezi punctul 4.14.

## 4.6.11. Determinarea germenilor patogeni

Determinarea germenilor patogeni în produsele din carne aduce informații suplimentare utile asupra salubrității lor, încercînd să bareze punerea în consum a produselor nocive. Neputința practică de a determina toți germenii patogeni incriminați duce la alegerea celor mai des utilizați și cu implicațiile cele mai serioase sănătății consumatorului.

*Determinarea Salmonellei* este obligatorie la toate produsele din carne, dată fiind răspîndirea ei mare în regnul animal și posibilitățile de producere la om a infecției Salmonellozice, mai ales enterale, dar și (mai rar), cu alte localizări — urinare, septicemii etc. Se execută ca la punctul 4.6.9.1.

*Determinarea numărului de stafilococi coagulazo-pozitivi* se face ca la punctul 4.6.9.2.



Scanned with OKEN Scanner

*Determinarea altor germeni patogeni* poate fi făcută după nevoi, în practică însă cei enumerați sînt suficienți pentru a ne prezenta imaginea sanitației microbiologice a produsului cercetat.

*Decelarea bacilului Botulinic* este extrem de dificilă și neconcludentă, dar cu implicații așa de grave pentru sănătatea omului. Pentru aceasta, mai comod și mai concludent, este cercetarea prezenței toxinei botulinice.

Se omogenizează 10 g de produs cu 10 ml ser fiziologic în mojar steril. Se centrifughează 10 minute la 3 000 t/min.

Supernatantul astfel obținut se injectează cîte 0,5 ml intraperitoneal la 2 șoareci și tot cîte 0,5 ml supernatant încălzit la 100°C la 2 șoareci, iar la alt grup de cîte 2 șoareci protejați prin ser antitoxic A, B și E cîte 0,5 ml cu 30 minute înainte, se injectează tot cîte 0,5 ml supernatant. În cazul în care produsul a conținut toxină botulinică șoarecii neprotejați, sau cei cu altă toxină decît cea incriminată, mor.

Se urmăresc pînă la 3—4 zile, pentru apariția semnelor de boală, care apare la 2—12 h manifestată prin : contractura musculaturii abdominale, tulburări respiratorii, paralizia trenului posterior, stare generală proastă.

## 4.6.12. Analiza parazitologică a cărnii și produselor din carne

Analiza parazitologică a cărnii și produselor din carne, cuprinsă într-un capitol separat, este în general de resortul organelor sanitar-veterinare, care în acest fel barează accesul la consum al produselor infestate. Trichinella spiralis, Cysticercus cellulosae (formă larvară a teniei umane), Echinococus granulosus, helminți din ordinul Stongylata, Fasciola hepatica, Dicrocelium lanceolatum sînt cîțiva din paraziții mai importanți cu răsunet și uneori foarte grav în patologia umană.

## 4.6.13. Analiza trichineloscopică

### 4.6.13.1. Recoltarea probelor

În sala de tăiere, se recoltează, de la fiecare jumătate de porc, din pilierii diafragmei (10—20 g de probă). Dacă pilierii diafragmei au fost ridicați în timpul prelucrării, se iau probe din porțiunea cărnoasă a diafragmei sau din mușchii intercostali.

La carnea de porc adusă din alte localități, fără acest examen și fără diafragmă, probele se iau din mușchii limbii, laringieni, musculatura intercostală sau abdominală.

Din cărnurile conservate — carne saramurată, șunci, bucăți de slănină cu straturi de carne — se iau din fiecare bucată cîte trei probe, din apropierea oaselor sau tendoanelor.

Probele se recoltează în cutiuțe de metal pe a căror capac se notează un număr de ordine.



Scanned with OKEN Scanner

### 4.6.13.2. Pregătirea probelor

Din fiecare probă se fac 7 secțiuni în lungul fibrelor musculare (pe cît posibil în apropierea inserției tendonului). De la fiecare animal se fac 14 secțiuni care se pun pe cele 14 cîmpuri ale compresorului.

Secțiunile puse între lamele compresorului trebuie presate în așa fel încît prin transparența lor să se poată citi textul dintr-o carte.

Clarificarea cîmpurilor trichineloscopice se realizează prin tratarea cîmpurilor estompate cu soluții acide (acid clorhidric 0,05 N, acid acetic, oțet alimentar de 9°) sau bazice (hidroxid de sodiu 3%). Practic, se procedează astfel : după repartizarea secțiunilor pe lama inferioară a compresorului, acestea sînt presate cu lama superioară. Apoi, lama superioară se ridică și cu pipeta sau cu o sticluță cu picător se adaugă pe fiecare secțiune soluția clarificatoare. După 1—2 minute se reașează lama superioară, se strîng șuruburile compresorului și se examinează.

### 4.6.13.3. Examinarea probelor

Examinarea se face cu ajutorul unui dispozitiv numit compresor, care se adaptează la un aparat — trichinoscop — ce poate fi portativ sau proiector.

Ținînd seama de stadiul de evoluție a parazitului la examenul trichineloscopic se pot găsi :

a) larve în stadiu de spirale (2—35 zile de infestare). Larva seamănă cu un tirbușon. Cuticula este transparentă, omogenă, cu anulațiuni fine, mai pronunțate pe partea dorsală. Uneori, la compresarea preparatului, larvele trec în zonele învecinate cu suc de carne, unde fac mișcări de răsucire sau sînt lipite de porțiunile de carne, încît se pot confunda cu capetele îndoite ale fibrelor musculare ;

b) larve în stadiu de capsulare (aproximativ 4 săptămîni de la infestare). În acest stadiu se observă :

— capsula omogenă, hialină, sticlos-transparentă, acelulară, lamelată, dublu conturată și delimitată net de țesutul din jur ;

— parazitul de formă spirală, caracteristică, scăldat într-o magmă albuminoasă cu resturi de sarcoplasmă și nuclei din fibrele musculare degenerate ;

— chiști, care sînt de formă ovulară alungită, prezentînd la extremități cîte un mic tubercul ce-l face să semene cu o lămîie. După 6—8 săptămîni de la infestare la cei doi poli ai chistului se pot găsi depozite de celule adipoase.

În stadiul de calcifiere (după cel puțin 6 luni de la infestare) se pot găsi :

— chiști cu început de calcifiere, cînd capsula are depuneri de săruri de calciu la poli. Larva este bine vizibilă, vie, infestantă ;

— chiști în plin proces de calcifiere, cînd capsula are depuneri reduse de săruri de calciu pe întreaga suprafață, cu predominență la poli, tulbure. Larva este mai puțin vizibilă, dar vie, infestantă ;



Scanned with OKEN Scanner

— chişti calcifiaţi — capsula are depuneri de calciu intense şi uniforme, parţial transparenţa spre opacitate uniformă. Larva este foarte greu sau deloc vizibilă, vie ;

— chişti complet calcifiaţi, cînd capsula este puternic calcifiată, opacă. Larva calcifiată şi ea, este vizibilă numai după decalcifiere, moartă, neinfestantă.

Procesul de calcifiere face ca formele chistice de *Trichinella spiralis* să devină vizibile cu ochiul liber. Chiştii apar ca nişte formaţiuni punctiforme de 500—800 μm, dar întotdeauna sub 1 mm, de culoare alb-gri, în contrast cu fondul roz al muşchiului.

Aprecierea gradului de infestare se face în funcţie de numărul cîmpurilor în care a fost depistat parazitul.

Infestarea poate fi :

— masivă (cînd parazitul este prezent în mai mult de 5 secţiuni din cele 14 de pe compresor) ;

— slabă (cînd parazitul este prezent în mai puţin de 5 secţiuni de pe compresor).

## 4.6.14. Analiza microbiologică a saramurilor şi soluţiilor

În preparatele din carne se întrebuinţează diverse concentraţii de saramuri, soluţii de nitriţi, nitraţi, amidon, zahăr, gelatină etc. Saramura şi soluţiile trebuiesc pregătite cu apă care să corespundă condiţiilor de potabilitate, de preferat fiartă şi răcită şi păstrarea lor să se facă pînă la injectare la temperatură sub 10°C. Toate substanţele care se adaugă în soluţie trebuie să corespundă normelor microbiologice (zahăr — STAS 11499/81 ; gelatină — NII 5073/72 etc.).

Dintre acestea cea mai periculoasă (pentru impurificarea preparatelor este gelatina, întrucît poate contamina produsul cu clostridii, streptococi fecali, stafilococi, drojdii şi mucegaiuri, toate foarte dăunătoare salubrităţii şi conservabilităţii preparatelor.

Din aceasta rezultă şi necesitatea controlului microbiologic al soluţiilor şi saramurilor folosite, mai ales al preparatelor la care nu intervine un procedeu termic suficient.

În toate aceste saramuri şi soluţii prezenţa germenilor patogeni (Salmonella, stafilococul coagulazo-pozitiv genul Clostridium, drojdii şi mucegaiuri), ridică cel puţin un semn de întrebare şi de obicei ar trebui să anuleze continuarea procesului de preparare a produselor.

## 4.6.15. Analiza microbiologică a adjuvanţilor şi condimentelor

În preparatele din carne, se întrebuinţează unii adjuvanţi (polifosfaţi, soia) şi condimente (piper, coriandru, nucşoară etc.). Dacă pentru condimente cantităţile adăugate sînt foarte mici, pentru ceilalţi adjuvanţi pot ajunge pînă la 8—10%. De aici rezultă şi importanţa mai mare care trebuie acordată adjuvanţilor.



Scanned with OKEN Scanner

Soia fiind un preparat proteic, obținut din planta cu același nume, poate impurifica preparatele din carne, nu atît de la prepararea ei, întrucît aceasta se face în condiții moderne de fabricație, cît mai ales din transport și depozitare. Ținută în condiții necorespunzătoare, cu umiditate ridicată, poate apărea procesul de mucegăire, care se repercutează asupra preparatelor. De aceea, trebuie cercetată prezența germenilor patogeni, a drojdiilor și mucegaiurilor, și numărul total de germeni să nu fie mai mare de 50 000/g.

În privința condimentelor, cercetătorii americani au găsit număr foarte mare de germeni/gram de produs (peste 10 000 000) la unele probe de piper negru sau boia, dar la alte loturi din același produs au găsit NTG mai mic.

Cu toate acestea ei consideră că numărul total de germeni (NTG) mai mare de 100 000/g, ar trebui să declanșeze un mecanism adecvat de sterilizare numai la produsele care nu suferă proces termic. De asemenea, cercetarea germenilor patogeni și a drojdiilor și mucegaiurilor, se impune cel puțin o dată pentru fiecare lot și ori de cîte ori NTG depășește 1 000 000/g.

Norme de calitate. În privința cărnii și a preparatelor din carne, prevederile precise ale STAS 2356/82 sînt de un real folos, iar îndeplinirea condițiilor microbiologice prevăzute conform lui, face ca respectivul produs să fie corespunzător.

## 4.6.15. Condiții de calitate microbiologică

La examenul bacteriologic al cărnii, pe frotiul recoltat de la suprafață, nu trebuie să existe mai mult de 20 germeni pe un cîmp microscopic și nu trebuie să fie prezente fragmente de țesuturi ; pe frotiul recoltat din profunzime nu trebuie să existe germeni.

| | | |
|---|---|---|
| Bacteriile din genul Salmonella | : | absente/25 g |
| Clostridii sulfito-reducătoare | : | maximum 1 g |

*Carnea tocată și semipreparate din carne tocată*
(pastă de mici, cîrnați proaspeți etc.)

| | | |
|---|---|---|
| Escherichia coli | : | maximum 1 000/g |
| Salmonella | : | absent/25 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 1 000/g |

*Preparate din carne sărată și/sau afumată*

| | | |
|---|---|---|
| Bacterii coliforme | : | maximum 100/g |
| Escherichia coli | : | maximum 10/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 10/g |

*Mezeluri* (prospături, salamuri semiafumate)

| | | |
|---|---|---|
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Escherichia coli | : | maximum 1/g |



Scanned with OKEN Scanner

| | | |
|---|---|---|
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 10/g |
| Bacillus cereus | : | maximum 100/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | : | maximum 100/g |

*Salamuri crude uscate*

| | | |
|---|---|---|
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 100/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | : | maximum 100/g |

*Produse din carne (mixte sau simple) gata pregătite, care se consumă reci*, fără altă prelucrare termică (piftii, aspicuri, pateuri din carne și organe, salate cu maioneză etc.).

| | | |
|---|---|---|
| Număr total de germeni aerobi mezofili (NTG) | : | maximum 100 000/g |
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Escherichia coli | : | maximum 1/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 1/g |

*Mîncăruri gătite* (servite calde)

| | | |
|---|---|---|
| Număr total de germeni aerobi mezofili (NTG) | : | maximum 10 000/g |
| Bacterii coliforme | : | maximum 1/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 1/g |
| Bacillus cereus | : | maximum 1/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | : | maximum 1/g |

*Mîncăruri gătite congelate*

| | | |
|---|---|---|
| Număr total de germeni aerobi mezofili (NTG) | : | maximum 100 000/g |
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Escherichia coli | : | maximum 1/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 1/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | : | maximum 10/g |

*Semipreparate tip „Gospodina : (semipregătite, crude)*

| | | |
|---|---|---|
| Escherichia coli | : | maximum 1 000/g |
| Salmonella | : | absent/25 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 1 000/g |

*Gelatina alimentară*

| | | |
|---|---|---|
| Număr total de germeni aerobi mezofili (NTG) | : | maximum 100 000/g |
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Salmonella | : | absent/25 g |
| Stafilococi coagulazo-pozitivi | : | maximum 100/g |
| Bacillus cereus | : | maximum 100/g |
| Bacterii anaerobe sulfito-reducătoare | : | maximum 100/g |

Pentru alte preparate, interpretarea rezultatelor se va face prin asemănare cu produsele menționate.



Scanned with OKEN Scanner

## 4.7. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A CONSERVELOR

Conservele supuse analizei microbiologice pot fi împărțite în mai multe categorii, după natura lor și modul de prelucrare termică și anume :

a) semiconserve din carne și pește nesupuse unui tratament termic ;
b) semiconserve din carne pasteurizate fără tratament termic ;
c) conserve din carne sterilizate ;
d) conserve sterilizate de legume și fructe.

În vederea realizării examenului microbiologic al conservelor, se recoltează un număr de probe care să reprezinte procentul de 2‰, însă nu mai puțin de 10 recipiente. Recipientele recoltate pentru examenul microbiologic se ambalează, sigilează și etichetează după care se trimit la laborator.

Examenul de laborator începe printr-un control al aspectului exterior. Prin acest control se pot face următoarele observații :

*la cutii*
— deformarea capacelor sau a corpului cutiei ;
— prezența ruginii, gradul de răspîndire și pătrundere a ruginii ;
— bombarea capacelor sau a corpului cutiei ;
— ermeticitate necorespunzătoare (scurgerea de conținut, existența unor eventuale perforații) ;
— defecte de sudură.

*la borcane*
— bombarea capacului ;
— ermeticitate necorespunzătoare (capace care nu sînt bine fixate, scurgere de conținut).

Se elimină ca necorespunzătoare, recipientele care prezintă bombaj biologic, închidere necorespunzătoare, fisuri (scurgere de conținut).

### 4.7.1. Proba termostatării

La recipientele găsite corespunzătoare în urma examenului exterior, se îndepărtează eticheta, apoi se curăță și se introduc în termostat. Incubarea se face la temperatura de 35°C pentru punerea în evidență a microorganismelor mezofile, timp de 7 zile, iar pentru microorganismele termofile, incubarea se face la temperatura de 45°C, în cazul recipientelor de sticlă cu închidere tip Omnia sau Twist-off și la temperatura de 55°C, în cazul recipientelor de tablă, timp de 5 zile. În cursul incubării, în termostat (termostatării), recipientele se examinează zilnic considerîndu-se necorespunzătoare și eliminîndu-se cele cu bombaj biologic (persistența bombajului și la apăsarea cu degetul), precum și cele la care se observă scurgerea de conținut.

La sfîrșitul termostatării, recipientele se scot din termostat și se răcesc la temperatura camerei, după care se supun examenului microbiologic propriu-zis.



Scanned with OKEN Scanner

## 4.7.2. Recoltarea probei pentru analiză

În vederea deschiderii și prelevării probei pentru analiză, se curăță și se degresează suprafața exterioară a recipientelor, se agită pentru omogenizare, se dezinfectează capacul (cel neștanțat) cu alcool și se flambează.

Deschiderea recipientului se face prin perforarea capacului cu perforatorul metalic în prealabil flambat), în cazul produselor cu consistență fluidă sau prin tăierea unei porțiuni circulare din capac cu ajutorul dispozitivului de deschis cutii de conserve, în cazul produselor cu consistență solidă. În tot timpul acestei operații, se îndreaptă flacăra unui bec de gaz spre locul deschiderii, pentru a steriliza aerul ce poate fi absorbit în interiorul recipientului.

Din recipientul deschis se recoltează 4—5 g produs cu ajutorul unei pipete cu orificiul larg, dacă produsul este fluid sau semifluid, sau cu ajutorul unei sonde de sticlă din zona centrală a recipientului, dacă produsul este solid.

## 4.7.3. Analiza bacterioscopică

Examentul bacterioscopic sau examenul microscopic direct constă în examinarea preparatului microscopic colorat Gram sau cu albastru de metilen și numărarea microorganismelor existente pe un cîmp microscopic. Se examinează 10 cîmpuri microscopice și se notează numărul de microorganisme existente pe fiecare cîmp.

Numărul de germeni pe un cîmp microscopic se stabilește făcînd media aritmetică a microorganismelor numărate pe cele 10 cîmpuri analizate.

## 4.7.4. Analiza prin culturi

Microorganismele care se pun în evidență, mediile de cultură folosite în acest scop, precum și condițiile de incubare stabilite în funcție de pH-ul probei pentru analiză sînt cuprinse în tabelul nr. XXXI.

*Tabel nr. XXXI*

| *PH probei de analizat* | *Grupul de microorganisme* | *Mediul de cultură* | *Condițiile de incubare în termostat* |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Conserve cu *p*H-ul mai mare de 4,5 | bacterii aerobe mezofile | — bulion glucozat<br>— agar glucozat înclinat | 35°C timp de 72 h |

(continuare) *tabel nr. XXXI*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| | bacterii anaerobe mezofile sau termofile | — bulion glucozat cu carne fiartă sau cu ficat sau<br>— bulion glucozat cu mazăre sau<br>— bulion VF cu acid tioglicolic și albastru de metilen | 35°C respectiv 55°C timp de 72 h |
| | bacterii termofile de acrire fără bombaj | — bulion cu purpur de crom-crezol | 55°C timp de 72 h |
| Conserve cu *p*H-ul mai mic de 4,5 | bacterii aerobe mezofile | — bulion glucozat cu suc de tomate | 35°C timp de 72 h |
| | bacterii anaerobe mezofile și termofile | — bulion glucozat cu suc de tomate și carne fiartă sau<br>— bulion glucozat cu suc de tomate și mazăre | 35°C și respectiv 55°C timp de 72 h |
| | bacterii termofile de acrire fără bombaj | — bulion acid cu peptonă și apă de drojdie | 55°C timp de 72 h |
| | drojdii și mucegaiuri | — agar malț sau<br>— agar glucozat cu cartofi sau<br>— mediu tip Czapek-Dox | 22°C timp de 5 zile |

În fiecare eprubetă care conține mediul de cultură adecvat fiecărei grupe de microorganisme, în funcție de pH-ul probei, se însămînțează circa 1 g produs.

În timpul perioadei de incubare în termostat, mediile însămînțate se examinează zilnic. Dacă apar semne de dezvoltare microbiană în mediile de cultură, se fac două preparate microscopice care se colorează unul Gram și celălalt pentru evidențierea sporilor bacterieni.

În cazul în care la examenul microscopic nu se găsesc forme sporulate, ci doar bacterii nesporulate, se fac treceri din bulion glucozat pe agar glucozat înclinat. Se incubează la 35°C timp de 24 h—48 h și se examinează din nou un preparat microscopic colorat, tot pentru evidențierea sporilor bacterieni.

Dacă nici în acest caz nu se găsesc spori, se consideră că proba conține bacterii nesporulate.

Toate culturile microbiene care au prezentat semne de creștere în profunzimea mediilor anaerobe și nu se dezvoltă în condiții aerobe pe agar glucozat înclinat, indică prezența bacteriilor anaerobe în proba pentru analiză.

Culturile termofile aerobe din conservele cu pH mai mare de 4,5 care au prezentat semne de dezvoltare microbiană și la care se produce



Scanned with OKEN Scanner

virarea culorii mediului de la roșu-purpuriu la galben, indică prezența bacteriilor de acrire fără bombaj.

Culturile termofile aerobe provenite din conservele cu pH mai mic de 4,5 care au prezentat semne de dezvoltare microbiană, indică prezența bacteriilor de acrire fără bombaj.

Culturile de pe mediul pentru drojdii și mucegaiuri se examinează microscopic ; prezența microorganismelor cu morfologie caracteristică acestora, confirmă prezența lor în proba de analizat.

În cazul în care la sfîrșitul perioadei de incubare nici una din eprubetele cu medii nu prezintă semne de dezvoltare microbiană, se consideră că proba pentru analiză nu conține microorganisme reziduale vii.

Norme de calitate :

Se consideră necorespunzător din punct de vedere microbiologic conservele la care :

a) după termostatare se constată bombaj biologic și/sau scurgere de conținut, modificări de miros și/sau aspect al conținutului, determinate de o activitate microbiană ;

b) la examenul microscopic direct se observă :

— în medie mai mult de 10 microorganisme pe cîmp microscopic și/sau mai mult de 20 cîmpuri pozitive pentru filamente de mucegai în cazul conservelor destinate alimentației copiilor ;

— în medie mai mult de 30 microorganisme pe cîmp și conținut acidifiat (în cazul celor analizate pentru acrire fără bombaj) ;

c) la examenul prin culturi se observă prezența uneia din următoarele grupe de microorganisme :

— bacterii aerobe nesporulate și anaerobe ;
— bacterii termofile de acrire fără bombaj ;
— drojdii și mucegaiuri.

## 4.8. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A OUĂLOR

### 4.8.1. Ouăle proaspete

Ouăle de consum trebuie să aibă coaja curată și să provină de la păsări sănătoase. Ele nu se examinează microbiologic în mod curent, ci numai în situații speciale. Pentru aprecierea calității microbiologice se determină :

— numărul total de bacterii aerobe mezofile de pe coajă ;
— prezența Salmonellelor pe coajă și în conținut ;
— sterilitatea conținutului.

a) *coaja ouălor ;* cu un tampon steril se șterge foarte bine suprafața cojii oului, după care se introduce în 10 ml ser fiziologic steril. Se fac diluții decimale, după care se fac însămînțări pentru determinarea :

— numărului total al germenilor (NTG) ;
— prezența Salmonellelor.

b) *conținutul ouălor ;* — se spală bine cu peria coaja oului, după care se introduce în spirt medicinal timp de 30 minute. După acest timp,



Scanned with OKEN Scanner

se scoate oul, se sparge în apropierea flăcării de gaz, cu un bisturiu steril și se golește de conținut într-un vas Erlenmayer cu perle de sticlă.

Se omogenizează foarte bine, după care se procedează la efectuarea diluțiilor decimale din care se fac însămînțări pentru :

— număr total de germeni aerobi mezofili ;
— prezența Salmonellelor.

Ouăle cu calitate microbiologică corespunzătoare trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

— numărul total de germeni pe coajă să fie mai mic de 1 000 000 germeni/întreaga coajă ;
— absența Salmonellelor de pe coajă ;
— absența microorganismelor, inclusiv a Salmonellelor în conținut.

În cazul ouălor alterate se fac examene pentru precizarea cauzei.

## 4.8.2. Analiza microbiologică a prafului de ou

Praful de ouă nu este un produs steril. La fel ca pentru praful de lapte, contează foarte mult calitatea materiei prime și modul în care decurge procesul tehnologic : tipul de uscare, temperatura atinsă, modul de răcire și modul de ambalare și păstrare.

Praful de ouă trebuie să aibă caracteristici microbiologice superioare, deoarece se folosește în mod frecvent la pregătirea unor alimente care nu se supun tratamentelor termice înainte de consum (creme, maioneze).

Pentru stabilirea calității igienico-sanitare a prafului de ouă, se fac determinări conform Ordinului Ministerului Sănătății 184/1973 și produsul trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

| | | |
|---|---|---|
| — numărul total de germeni aerobi mezofili | : | maximum 100 000/g |
| — bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| — Salmonella | : | absent/50 g |
| — Stafilococ auriu coagulazo-pozitiv | : | maximum 1/g |
| — Drojdii | : | maximum 10/g |
| — Mucegaiuri | : | maximum 10/g |

Pentru Salmonella, se recoltează steril 50 g praf de ouă pentru fiecare probă.

Pentru ceilalți indicatori se recoltează steril 10 g produs de fiecare probă.

## 4.8.3. Analiza microbiologică a maionezei

În condiții normale, maioneza prin pH-ul acid nu oferă un mediu de înmulțire și nici chiar de conservare pentru microorganisme.

În cazul în care ouăle din care a fost preparată maioneza au fost infectate cu bacterii patogene din genul Salmonella, sau cu stafilococi enterotoxici, produsul poate să dea naștere prin consumul său la izbucniri de toxiinfecții alimentare.



Scanned with OKEN Scanner

De aceea, pentru precizarea calității igienico-sanitare a maionezei, se fac următoarele determinări :

— numărul total de germeni aerobi mezofili (NTG) ;
— bacterii coliforme ;
— Salmonella ;
— Stafilococ auriu coagulazo-pozitiv ;
— Drojdii și mucegaiuri.

Potrivit Normei tehnice de ramură (NTR) 3227/1984, maioneza trebuie să îndeplinească din punct de vedere microbiologic următoarele condiții :

| | | |
|---|---|---|
| NTG | : | maximum 100 000/g |
| Bacterii coliforme | : | maximum 10/g |
| Salmonella | : | absent/50 g |
| Stafilococ auriu coagulazo-pozitiv | : | maximum 10/g |
| Drojdii și mucegaiuri | : | maximum 100/g |

## 4.9. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A BĂUTURILOR

În alimentația umană lichidele ocupă o parte foarte importantă, indispensabilă desfășurării normale a proceselor vitale ale organismului. Dacă cea mai mare parte a lichidelor cu care se alimentează organismul este reprezentată de apa potabilă, o parte mai mică sau mai mare este reprezentată de alte băuturi.

După prezența alcoolului etilic în ele, se împart în : băuturi nealcoolice (apă minerală, sucuri, concentrate de fructe etc.) și alcoolice (vin, bere, cidru, țuică, vodcă, coniac etc.).

### 4.9.1. Băuturile nealcoolice

Băuturile nealcoolice reprezintă partea cea mai importantă și cu răspîndirea cea mai largă în toate grupurile de populație, consumul lor fiind pe plan mondial ca și la noi în țară, la un nivel foarte ridicat și tinzînd să înlocuiască în alimentație apa potabilă.

Din punct de vedere microbiologic, ele se pot prezenta consumatorilor ca nepasteurizate și mult mai bine, dar și mult mai rar, ca băuturi pasteurizate.

*Microorganismele* prezente în băuturile nealcoolice duc la scurtarea perioadei de stabilitate și chiar la alterarea acestor băuturi. Cu cît un produs este mai bogat în zaharuri, vitamine, eventual substanțe proteice, cu atît dezvoltarea microorganismelor este favorizată și printre acestea se pot strecura germeni patogeni transmițători de boli.

În băuturile sărace (apa minerală) sau cu pH-uri foarte acide nu numai că este împiedicată dezvoltarea majorității microorganismelor, dar se constată chiar un efect bactericid în timp, cu condiția ca NTG să fie de valoare mică, normală, naturală.



Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, acidul citric, lactic, bioxidul de carbon, din compoziția multor băuturi, au efect distructiv asupra multor microorganisme, fără afectarea sporilor, drojdiilor și mucegaiurilor.

În produsele care conțin zahăr, genul Leuconostoc este adus de către acest produs insuficient și incorect preparat sau rafinat, ducînd la alterarea băuturilor.

Cu toate acestea pentru băuturile nepasteurizate, durata de folosire este foarte limitată și în funcție de temperatura de păstrare. La temperatura de 10°C se pot păstra maximum 7 zile.

*Germenii patogeni* din aceste produse sînt pătrunși prin multiple posibilități de contaminare din timpul procesului tehnologic, de la materiile prime incorect prelucrate, utilaje și recipiente murdare, condiții proaste de igienă ale personalului din procesul de producție.

S-au descris toxiinfecții alimentare cu germeni vehiculați de băuturi ca : Salmonella, Escherichia coli, Aeromonas, Clostridium, Bacillus cereus etc.

Importanța respectării normelor de igienă în timpul întregului proces tehnologic de fabricație, rezultă din cele expuse mai sus, pentru a preveni infectarea accidentală a produselor. S-a observat că, în băuturile preparate industrial, nu pătrund germeni patogeni, ci numai germeni de alterare a produsului.

Majoritatea episoadelor de toxiinfecție alimentară au fost cu procese tehnologice artizanale, incorecte.

Dacă în timpul procesului de fabricație partea cea mai infectată a produsului (concentratul) suportă un proces termic, atunci riscurile de infecție sînt mai mici.

*Examenul microbiologic* constă în încercarea de a surprinde produse contaminate, susceptibile de a produce fenomene morbide. El se realizează, fie indirect prin cercetarea indicatorilor sanitari (NTG, bacterii coliforme și bacili coli), fie direct căutînd germenii patogeni mai obișnuiți (enterobacteriacee) transmițători de boală.

NTG/ml se execută pe geloză nutritivă ca la punctul 2.4.

Bacteriile coliforme se cercetează ca la punctul 2.4.

Numărul probabil de Escherichia coli fecal se execută ca la punctul 2.4.

Determinarea germenilor patogeni se face ca la punctul 2.4.

Din cele arătate mai sus, se poate cu ușurință observa că ordinile de mărime ale necesităților microbiologice sînt comparabile cu cerințele microbiologice cu apa potabilă (STAS 1342/81).

## 4.9.2. Băuturile alcoolice

Băuturile obținute prin procese de fermentație alcoolică din diverse substraturi, intervin ocazional în alimentația populației, mai ales la vîrste adulte. Din acest punct de vedere, interesul nostru pentru calitățile microbiologice ale acestor băuturi este diminuat, la aceasta contribuind și faptul



Scanned with OKEN Scanner

că s-a observat că o bună parte din germenii patogeni sînt distruși la concentrațiile de alcool etilic.

După cantitatea de alcool pe care o conțin se împart în : băuturi slab alcoolizate și băuturi tari spirtoase.

### 4.9.2.1. **Băuturi slab alcoolice** (fermentabile)

Băuturile slab alcoolice sînt reprezentate de către vin, bere, cidru, hidromel etc.

Dintre acestea un interes deosebit îl are berea, care cel puțin în ultimii ani își crește continuu cantitatea consumată de populație și datorită procentului slab de alcool, ca și substratului bogat de fermentație, prezintă riscuri mari de autoalterare și de declanșare a unor îmbolnăviri în masă.

Cercetări făcute în decursul timpurilor de către mulți cercetători, au arătat că supraviețuirea germenilor patogeni în bere este destul de îndelungată, de ordinul zilelor. Cu toate acestea, s-a observat că între dispariția bacteriilor și cantitatea lor este un paralelism, cu cît cantitatea era mai mare, supraviețuirea era mai îndelungată.

Fapt important este observația că nici una dintre tulpini nu s-a înmulțit, datorită probabil condițiilor de pH acid. Pentru a preveni apariția germenilor enterici patogeni, se folosește ca indicator sanitar prezența bacteriilor coliforme, care se cercetează în bere după metoda de la laptele pasteurizat și după agitarea probei pentru eliminarea bioxidului de carbon și neutralizarea ei cu o soluție normală de hidrat de sodiu.

În privința vinului, importanța microbiologiei medicale este mică, pentru că alcoolul conținut împreună cu timpul mare de preparare al lui duce la dispariția majorității germenilor patogeni. Din contră, pentru bolile vinului, microbiologia este extrem de importantă, știut fiind că majoritatea alterărilor vinului sînt datorate unor alte microorganisme de fermentare și care nu fac obiectul microbiologiei alimentare. Mult mai puțin răspîndite la noi, cidrul și hidromelul pot prezenta alterări de fermentare și fiind slab alcoolice pot transmite germeni patogeni.

### 4.9.2.2. **Băuturi tari spirtoase** (distilate)

Băuturile tari spirtoase sînt rezultate ale distilării unor substanțe fermentate alcoolic. Din acest punct de vedere datorită, pe de o parte distilării și pe de altă parte tăriei alcoolice, germenii patogeni nu pot rezista și deci nu pot constitui un pericol microbiologic pentru sănătatea consumatorilor.

*Microorganismele* din băuturi sînt reprezentate în marea lor majoritate prin flora de fermentație, așa-numitele bacterii lactice :

— coci hemolactici (Pedicoccus) ;
— coci hetrolactici (Leuconostoc) ;
— bacili hemolactici (Lacto Bacillus Plantarum) ;
— bacili hetrolactici (Lacto Bacillus Fructivorans).



Scanned with OKEN Scanner

Aceștia dacă reușesc să se înmulțească după fermentația alcoolică, degradează băuturile, ducînd la acrirea lor.

În bere, cidru, hidromel, putem găsi o mare varietate de germeni (Escherichia coli, Aerobacter, Penicillium, Actinomices, Bacillus mezentericus etc.).

Examenul microbiologic constă în determinarea numărului probabil de bacterii coliforme, determinarea germenilor patogeni (numai în cazuri de suspiciune) și determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri, cercetîndu-se și speciile predominante.

Pentru băuturile tari spirtoase se cercetează în eventualitatea suspicionării unei infecții, germenii patogeni (mai ales sporulați) și drojdii și mucegaiuri.

Normele de calitate ale băuturilor sînt reprezentate prin Ordinul Ministerului Sănătății 184/72 :

— *pentru bere*

| | | |
|---|---|---|
| bacterii coliforme | : | absent/ml |
| Escherichia coli | : | absent/ml |

STAS 10547-83 pentru *băuturi răcoritoare :*

| | | |
|---|---|---|
| — nepasteurizate NTG | : | maximum 300/ml |
| Bacterii coliforme | : | 10/ml |
| Drojdii și mucegaiuri | : | 10/ml |
| — pasteurizate NTG | : | 20/ml |
| Bacterii coliforme | : | absent/ml |
| Drojdii și mucegaiuri | : | absent/ml |

STAS 4450-1976 pentru *apa minerală :*

| | | |
|---|---|---|
| NTG | : | 100/ml |
| Bacterii coliforme | : | 1/100 ml |
| Salmonella | : | absent/1 l. |

## 4.10. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A ZAHĂRULUI ȘI PRODUSELOR ZAHAROASE

### 4.10.1. Examenul microbiologic al zahărului

Se recoltează cu ajutorul unei scafe metalice sterilizate cîte 250 g zahăr, care se introduce în recipiente sterile (borcane sau pungi de plastic), recoltarea fiind făcută de persoane instruite în acest scop.

În laborator, probele se efectuează prin însămînțarea produsului ca atare, sau a diluțiilor 1/5 și 1/10 în soluție fiziologică peptonată sterilă sau apă de robinet sterilă.

*Numărul total de germeni aerobi mezofili (NTG)* se determină prin încorporarea în geloză nutritivă a unor diluții decimale. Se incubează la 32°C timp de 48 h, se examinează și se iau în calcul cu plăcile care conțin între 30—300 colonii, se face media aritmetică și factorul de diluție.



Scanned with OKEN Scanner

*Determinarea prezenței germenilor din genul Leuconostoc* se face prin evidențierea dezvoltării unor colonii caracteristice, pe mediu solid specific, după o prealabilă îmbogățire și incubare ; examenul se execută pe o probă de 5 și pe una de 15 g zahăr recoltate în mod aseptic în baloane Erlenmayer, peste care se adaugă cîte 100 ml mediu îmbogățire și se incubează la temperatura camerei 5 zile. După aceasta se fac treceri cu ansa pe mediul agar zaharoză, 48 ore. Dezvoltarea pe mediu solid a unor colonii sticloase, filante și confluente indică prezența bacteriilor din genul Leuconostoc.

*Determinarea bacteriilor coliforme* se face prin însămînțarea în 3 tuburi cu mediu BBLV și confirmarea lor pe mediu Levin, indicîndu-se prezența sau absența lor. În general, acest grup de bacterii este rar întîlnit.

*Determinarea numărului de drojdii și mucegaiuri* se face după metoda descrisă la capitolul respectiv.

*Determinarea numărului de bacterii sporulate aerobe mezofile.* Proba cu diluția 1/5 se inactivează la baia de apă la 80°C timp de 20 minute, după care vasul se răcește cu jet de apă rece. Se fac apoi însămînțări, prin încorporarea a cîte 2 ml (corespund la 0,4 g zahăr), în 5 cutii Pétri peste care se toarnă 10—15 ml de agar nutritiv, topit și răcit la 45°C. Se incubează la 32°C timp de 3 zile, se numără cu lupa sau ochiul liber coloniile dezvoltate în profunzimea agarului din cele 5 cutii. Rezultatul obținut, înmulțit cu 5 reprezintă numărul de bacterii sporulate aerobe mezofile, raportat la 10 g zahăr.

*Determinarea numărului de bacterii sporulate termofile și a bacteriilor sporulate de acrire fără bombaj.* Gradul de contaminare cu bacteriile sporulate termofile se stabilește prin examinarea coloniilor apărute prin încorporarea unei cantități din probă în mediul agar peptonă triptică dextroză. Inactivarea se face din diluția 1/5 a probei însămînțîndu-se cîte 2 ml în 5 plăci cu mediul de mai sus, topit și răcit la 45°C prin încorporare.

După solidificare se incubează la termostat la temperatura de 55°C timp de 48 ore. Se examinează cu lupa și ochiul liber ; totalitatea coloniilor dezvoltate reprezintă numărul de bacterii sporulate aerobe termofile. Din acestea, numărul total de bacterii sporulate termofile de acrire fără bombaj, este dat de numărul de colonii care prin fermentarea glucozei virează culoarea mediului de la violet la galben. Întrucît în cele 5 plăci am însămînțat o cantitate totală de 2 g zahăr, rezultatul înmulțit cu 5 reprezintă numărul de bacterii raportat la 10 g zahăr.

*Determinarea bacteriilor sporulate anaerobe termofile producătoare de hidrogen sulfurat.* Această încărcătură a produsului în bacterii sporulate anaerobe termofile producătoare de hidrogen sulfurat se obține prin însămînțarea din diluția 1/5 a probei de analizat, după inactivarea prin căldură a formelor vegetative, prin incubarea la 55°C, în condiții de anaerobioză.

Însămînțarea se face în mediu agar sulfit de sodiu. În 5 tuburi de 100/250 se repartizează cîte 4 ml de probă (diluția 1/5) inactivată. În fiecare tub se adaugă mediul agar sulfit pînă la obținerea unei coloane de 15 cm. Se răcește sub jet de apă rece, pînă la solidificare. Se consideră pozitive, tuburile în care apar colonii negre sau se înnegrește întreaga coloană de mediu, datorită dezvoltării bacteriilor producătoare de hidro-



Scanned with OKEN Scanner

gen sulfurat. Cele care se înnegresc numai la suprafața mediului nu sînt pozitive. Rezultatul se exprimă prin raportul dintre numărul tuburilor pozitive și numărul tuburilor însămînțate (valori 0 ; 0, 2 ; 0, 4 ; 0, 6 ; 0,8 ; 1 sau procentul 20%, 40%, 60%, 80%, 100%).

*Determinarea bacteriilor sporulate anaerobe termofile producătoare de gaz (în afara hidrogenului sulfurat).* Se stabilește încărcătura cu aceste bacterii prin însămînțarea unei diluții 1/5 din proba de analizat în bulion peptonă triptică dextroză după inactivarea probei. Se repartizează în eprubete de 120/12 cîte 4 ml mediu lichid peste care se toarnă în 5 eprubete cîte 4 ml din diluția 1/5. Se acoperă suprafața mediului însămînțat cu 1 cm ulei de parafină steril. Se incubează într-un vas cu apă la 55°C timp de 72 h. Se consideră pozitive, eprubetele în care apar bule de gaz la limita de separare cu uleiul de parafină. Rezultatul se exprimă prin raportul dintre numărul eprubetelor pozitive și numărul eprubetelor însămînțate.

*Determinarea bacteriilor din genul Leuconostoc.* Pentru stabilirea prezenței acestor bacterii se folosește un mediu de îmbogățire lichid și un mediu solid agar-zaharoză ; din proba de cercetat se iau 3 probe : de 0,1 g ; 5 g ; și 15 g peste care se adaugă 100 ml mediu de îmbogățire. După 5 zile de incubare la temperatura camerei (20—22°C) se fac treceri pe mediu solid. Dezvoltarea pe aceasta a unor colonii sticloase, filante, confluente, indică prezența bacteriilor din genul Leuconostoc în cantitatea de probă însămînțată.

## 4.10.2. Analiza microbiologică a produselor zaharoase

Preparatele alimentare care conțin cantități mari de zahăr constituie produse zaharoase. La acesta se mai adaugă alte materii prime ca : miere, glucoză, produse lactate, grăsimi, ouă, cacao, făină, acizi și coloranți alimentari. În procesul tehnologic de preparare la toate aceste produse intervin una, sau mai multe tratamente termice (fierbere, coacere, prăjire, uscare). Deosebim următoarele categorii : bomboane din zahăr topit și glucoză la care se adaugă colorant și arome (caramele, dropsuri) ; fondantele, pralinele, drajeurile, produsele de ciocolată și cacao, fructe confiate, rahatul, halvaua etc. Toate acestea au o mare valoare alimentară datorită conținutului mare în principii energetice (zahăr), dar unele nu conțin substanțe proteice, grăsimi și vitamine și au puține săruri minerale.

### MICROORGANISME

Deși majoritatea produselor nu constituie mediu favorabil microorganismelor, datorită conținutului foarte mic de apă și concentrației crescute de zahăr ca și procesele termice tehnologice, totuși se pot găsi bacteriile sporulate. Mai importantă este contaminarea cu microorganisme datorate mai ales condițiilor igienico-sanitare defectuoase ale procesului tehnologic și cu manipulările ulterioare la ambalare și desfacere. Cercetări experimentale au arătat posibilitatea supraviețuirii îndelungate a unor germeni patogeni (S. Typhi).



Scanned with OKEN Scanner

Păstrarea acestor produse în condiții de umiditate sporită poate să ducă la apariția drojdiilor și mucegaiurilor (Penicillium, Mucor).

*Analiza microbiologică* constă în determinarea NTG pentru a exclude aportul unei cantități mari (peste 50 000/g) de microorganisme ; determinarea bacteriilor coliforme a căror prezență ar putea să indice o eventuală contaminare fecală ; determinarea drojdiilor și mucegaiurilor ; la suspiciune se fac determinări pentru bacterii sporulate (Bacillus subtilis) și alți germeni patogeni.

## 4.10.3. Produsele de cofetărie și patiserie

Din făină, ouă, unt, zahăr, fructe, arome se obțin preparate care pot fi clasificate în două grupe mari : prăjituri uscate (cozonac, brioșe, cornuri, pateuri) și prăjituri cu cremă sau frișcă. Aceste produse participă la alimentația omului cu o parte importantă, știut fiind că la copii ele constituie un element de bază. Dintre acestea, cele care suferă un proces termic (coacere), pot fi păstrate la loc uscat și răcoros timp mai îndelungat, în general toate prăjiturile uscate. Dar prăjiturile cu cremă sau frișcă reprezintă, în caz de infectare accidentală sau de proastă pregătire, un pericol pentru consumatori putînd da toxiinfecții alimentare cu răspîndire largă.

### MICROORGANISMELE DIN PRODUSELE DE COFETĂRIE ȘI PATISERIE

După cum rezultă din cele expuse mai sus, prezintă importanță numai cele preparate cu cremă sau frișcă, medii extrem de favorabile contaminării și dezvoltării de microorganisme patogene.

Prăjiturile uscate nu conțin decît bacterii sporulate și eventual drojdii și mucegaiuri care în condiții de umiditate pot altera produsul făcîndu-l impropriu consumului.

Cremele preparate cu lapte, ouă, unt sau frișcă reprezintă principalul izvor de transmitere a toxiinfecțiilor alimentare, constituind pentru majoritatea microorganismelor un mediu extrem de favorabil dezvoltării lor, sau elaborării de exotoxine. Cu cît procesul termic este mai slab, cu atît posibilitatea de transmitere a microorganismelor patogene este mai mare, în așa fel încît, preparatele cu creme de ou nefierte sau cu frișcă sînt cele mai periculoase. Contaminarea se face prin manipularea produselor în condiții neigienice care aduc germenii provocatori de boală (Salmonella, Shigella, Streptococcus, Stafilococcus și unele virusuri, ca virusul poliomielitic). Singura contaminare prin materie primă este dată de folosirea ouălor de rață la prepararea acestor produse, care pot fi contaminate cu Salmonella, de aceea folosirea lor este strict interzisă. Contaminarea unui produs cu Stafilococcus aureus elaborator de toxină, înainte de prelucrarea termică, nu reduce pericolul de toxiinfecții, întrucît această enterotoxină este termorezistentă.



Scanned with OKEN Scanner

## ANALIZA MICROBIOLOGICĂ

Examenul microbiologic trebuie să confere acestor produse, mai ales acelora care sînt preparate cu creme sau cu frișcă, un grad de securitate microbiologică. De aceea se execută mai ales probe indirecte care să nu arate contaminarea produsului final și absența germenilor patogeni. Metodele sînt cele folosite la produsele lactate : NTG, Bacterii coliforme, Escherichia coli fecal, Drojdii și mucegaiuri, Germeni patogeni.

Cerințele microbiologice sînt cele prevăzute în Ordinul Ministerului Sănătății 184/1972 :

| | | |
|---|---|---|
| NTG | : | 10 000/g |
| Bacterii coliforme | : | 10/g |
| Escherichia coli | : | 1/g |
| Salmonella | : | absent/25 g |
| Stafiloccocus | : | 10/g |
| B. cereus | : | 100/g |

*Înghețata* este un produs alimentar congelat, preparat dintr-un amestec de lapte, frișcă, smîntînă, zahăr, fructe și diferite substanțe pentru gust și aromă.

După compoziție, avem înghețată cu ouă sau fără ouă, din fructe sau siropuri de fructe, din frișcă (parfait), sau lapte. Rezultă că înghețata este un produs lactat cu un bogat conținut în grăsimi, substanțe proteice, săruri minerale, zaharuri și vitamine, un produs complet, cu gust plăcut, factor important în alimentație, mai ales în anotimpul cald.

Fiind un produs complet este în același timp și un mediu extrem de favorabil pentru *dezvoltarea microorganismelor*.

Se pot găsi microorganisme sporulate, nesporulate și chiar patogene. Dintre germenii mai frecvent întîlniți putem cita : Proteus, Pseudomonas fluorescens, Streptococi lactici, Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus. Sursele de infectare ale produsului finit sînt mai întîi materiile prime folosite la prepararea sa, apoi modul de tratare al amestecului, nerespectarea regimului de temperatură (fierbere, pasteurizare, răcire), condiții neigienice a personalului și mediului ambiant, contaminarea bacteriană la ambalare și stocare. Temperatura joasă reprezintă condiția favorabilă pentru păstrarea majorității microorganismelor și știut fiind că în afara unor rare excepții, nu le distruge, ci numai le oprește dezvoltarea.

După unii cercetători, laptele și derivatele sale, aduc aproximativ 90% din numărul total de bacterii, pînă la pasteurizare. Ouăle, fructele crude, substanțele aromatice sînt reponsabile de aportul microbian mai ales dacă sînt introduse după pasteurizarea amestecului.

## MICROORGANISMELE PATOGENE

Din cele arătate mai sus, dat fiind multitudinea de căi prin care produsul se infectează, pot pătrunde și germeni patogeni ca : Salmonella, Shigella, Streptococcus, Stafilococcus, Bacillus cereus, Mycobacterium tuberculosis, unele virusuri (al poliomielitei și probabil al hepatitei), genul Clostridium, drojdii și mucegaiuri etc.).



Scanned with OKEN Scanner

Efectul asupra sănătății este datorat pe de o parte acestor germeni, pe de altă parte și numai al aportului unui număr foarte mare de bacterii nepatogene, care creează disbacterioze cu represiuni asupra persoanelor sensibile, bătrîni, copii.

*Examenul microbiologic* urmărește aproape fidel pe cel al laptelui și produselor lactate, cu corecția că ingredientele auxiliare trebuie și ele riguros analizate, iar produsele fără procedeu termic sau cu adaosuri după aceasta trebuiesc supravegheate și analizate cu cea mai mare atenție.

*Recoltarea probelor* trebuie făcută din amestecul dinainte de pasteurizare cu pipete sterile, din produsele auxiliare în recipiente sterile, din materia finită cu ajutorul utilajelor sterile, sau din produse finite ambalate.

Probele trebuiesc transportate în lăzi izoterme la temperaturi sub 0°C și în laborator vor fi puse în lucru imediat. Păstrarea eventuală a lor nu poate fi făcută decît la temperatura de —10°C.

*NTG* se determină prin înglobarea unei cantități cunoscute de înghețată topită în geloză nutritivă.

*Determinarea bacteriilor coliforme* care poate indica gradul de contaminare al produsului în germeni enterici se face ca la produsele lactate.

*Germenii patogeni* se determină în caz de suspiciune cu extinderea diagnosticului, la toate materiile prime care au concurat la fabricarea produsului incriminat, în mod obișnuit cercetarea genului Salmonella, Shigella, Stafilococcus, Streptococcus este suficientă.

Normele de calitate sînt prevăzute în STAS 2444/71 și sînt redate în tabelul nr. XXXII.

*Tabel nr. XXXII*

| | *Înghețată cu adaosuri înainte de pasteurizare* | *Înghețată cu adaosuri după pasteurizare* | *Înghețată cu stafide, simburi, ciocolată* |
|---|---|---|---|
| NTG/g·cm³ | 250 000 | 1 000 000 | 1 000 000 |
| B. coliforme/g·cm³ | 15 | 45 | 100 |
| Germeni patogeni/g·cm³ | abs. | abs. | abs. |

## 4.10.4. Mierea

Mierea este un aliment natural produs de albine din materie primă furnizată direct de regnul vegetal (nectarul) și într-o măsură mai mică de cel animal (mana). Materia primă animală „mana" este formată din excrementele bogate în zaharuri ale unor insecte ce parazitează vegetația lemnoasă sau ierboasă, cum ar fi, purecii și păduchii de plante. Albinele le recoltează, le prelucrează, le îmbogățesc cu substanțe proprii și le transformă în produsul specific „mierea" pe care-l depozitează în celulele fagurilor. Are o mare valoare nutritivă datorită conținutului în hidrați de carbon ușor asimilabili în prezența fermenților (amilază, catalază etc.).



Scanned with OKEN Scanner

S-a observat că mierea are o acțiune bactericidă importantă, unii germeni din genul Salmonella, Shigella și Corynebacterium diphteriae dispar după 1—2 zile. Poate totuși conține, prin manipulările produsului la îmbuteliere și ambalare, prin contractul cu aerul din stupi și spațiile de extracție, o serie de microorganisme mai rezistente și sporulate.

Ea poate conține germeni din genul Bacillus subtilis și megatherium, micrococi, sarcine, mucegaiuri (Mucor, Penicillium, Aspergillus, Rhizopus), sau drojdii (Torulla, Saccharomyces, Zygosaccharomyces etc.).

*Analiza microbiologică a mierei* are o importanță minoră pentru produsul obținut natural și de calitate superioară. La aceasta, apa reprezintă abia 10—15% din conținut, proporție la care nici un microorganism nu se poate dezvolta și foarte multe dispar. De aceea, se execută mai ales cercetarea drojdiilor și mucegaiurilor care pot duce la alterarea mierii prin fermentare.

## 4.11. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A PÎINII, FĂINII ȘI CEREALELOR

### 4.11.1. Examenul microbiologic al pîinii

În țara noastră la această categorie de aliment nu se face examen microbiologic. De aceea, nu există nici o normă sanitară care să stabilească calitatea igienico-sanitară a pîinii în urma determinării unor indicatori microbiologici. În caz de suspiciune (condiții igienice de fabricare și păstrare precare), din fiecare șarjă de lucru se recoltează cîte o pîine, care se termostatează la 37°C timp de 72 h. Se consideră necorespunzătoare, proba la care, după termostatare, la rupere miezul este filant cu miros neplăcut.

### 4.11.2. Examenul microbiologic al făinii

În țara noastră singurul indicator microbiologic pentru determinarea calității igienico-sanitare a făinii este numărul de spori de Bacillus mesentericus. Determinarea numărului sporilor de Bacillus mesentericus se realizează după cum urmează :

Se cîntărește 1 g făină care se introduce într-o eprubetă cu 2 ml ser fiziologic steril și se omogenizează foarte bine.

Se fac apoi diluții decimale pînă la $10^{-4}$ (1 : 10 000).

Pentru distrugerea formelor vegetative se inactivează diluțiile prin menținerea la temperatura de 100°C timp de 20 minute. După inactivare se fac însămînțări prin încorporare în geloză nutritivă. Prezența a mai mult de 20 spori la 100 g făină este un indiciu asupra calității nesatisfăcătoare a făinii.



Scanned with OKEN Scanner

### 4.11.3. Examenul microbiologic al cerealelor

Se cîntăresc în mod steril 10 g de cereale peste care se toarnă 90 ml ser fiziologic steril și se agită puternic după care se trece la efectuarea diluțiilor decimale. Din diluții se fac însămînțări pentru :

a) determinarea numărului total de bacterii aerobe mezofile ;

b) determinarea numărului total de bacterii anaerobe termofile care produc hidrogen sulfurat ;

c) determinarea numărului de spori ai bacteriilor termofile care produc întinderea (numărul sporilor de Bacillus mesentericus) ;

d) determinarea de mucegaiuri.

## 4.12. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LEGUMELOR ȘI FRUCTELOR

### 4.12.1. Legume și fructe proaspete

Pentru determinarea calității igienico-sanitare a legumelor și fructelor se efectuează examenul microbiologic.

În privința acestui examen opiniile cercetătorilor sînt în direcția suprimării sale, deoarece în majoritatea cazurilor se izolează Escherichia coli și cînd nu se poate preciza dacă originea ei este umană sau din sol. Pe de altă parte, datorită unei circulații mari și a unor multiple manipulări, chiar în cazul unor rezultate pozitive, sursa este aproape imposibil de depistat. Datorită acestei situații, cît și faptului că nu există tendința unei extinderi a controlului microbiologic al legumelor și fructelor proaspete nu s-au făcut încercări de standardizare a metodelor microbiologice.

Examenul microbiologic al acestei categorii de alimente a rămas să fie efectuat numai atunci cînd se bănuiește că acestea să fi constituit o cale de transmitere în cazul unei izbucniri de epidemie, cînd se amenajează grădini pe terenuri irigate cu ape reziduale, cînd se urmărește un control al curățeniei și dezinfecției unor legume sau fructe care se consumă fără a fi prelucrate termic.

În general se utilizează metoda spălării unei cantități de legume sau fructe într-o cantitate cunoscută de apă de robinet sterilă sau de ser fiziologic steril. Se fac diluții decimale, după care se fac însămînțări pentru :

1) determinarea numărului total de germeni aerobi mezofili ;
2) determinarea bacteriilor din grupul coliformilor ;
3) determinarea Escherichia coli ;
4) determinarea absenței Salmonellei la 25 g produs ;
5) determinarea Stafilococului aureus coagulazo-pozitiv ;
6) determinarea drojdiilor și mucegaiurilor.

Rezultatele (cu excepția celor pentru bacteriile din genul Salmonella) se exprimă la 1 g legume sau fructe.



Scanned with OKEN Scanner

### 4.12.2. Legume uscate, deshidratate

După recoltarea, în mod steril, a unor probe reprezentative, acestea sînt cîntărite, de asemenea, în mod steril. De obicei, se cîntăresc 10 g produs care se omogenizează la omogenizator electric ATOMIX cu 90 ml apă distilată sterilă sau 90 ml de ser fiziologic tamponat steril. Aceasta conține diluția 10 l din care se fac o serie de diluții decimale ($10^{-2}$, $10^{-3}$).

Din diluție se fac însămînțări pentru :

a) numărul total de germeni aerobi mezofili ;
b) Escherichia coli ;
c) Stafilococcus aureus coagulazo-pozitiv ;
d) Bacillus cereus ;
e) Drojdii și mucegaiuri.

Pentru Salmonella, la care normele sanitare cer absența ei în 10 g produs, se face însămînțarea a 10 g produs în 90 ml mediu de preîmbogățire.

Toate determinările enumerate mai sus se fac folosind metodele și mediile obișnuite.

Produsele vegetale uscate (deshidratate) trebuie să îndeplinească conform Ordinului Ministerului Sănătății 184/1972, următoarele condiții :

— Număr total de germeni aerobi mezofili : maximum 100 000/g
— Escherichia coli : maximum 1 000/g
— Salmonella : absent/10 g
— Stafilococcus aureus coagulazo-pozitiv : maximum 100/g
— Bacillus cereus : maximum 100/g
— Drojdii și mucegaiuri : maximum 1 000/g

### 4.12.3. Examenul microbiologic al fructelor congelate

Din produsele de cercetat se ridică un număr de recipiente proporțional cu cantitatea existentă, dar cel puțin trei din fiecare produs. Transportul probelor la laborator se face în așa fel ca ele să ajungă congelate. Cu cîteva ore înainte de a începe analiza, se lasă produsele la temperatura camerei, ca să se decongeleze. Se curăță și se sterilizează capacele borcanelor.

După deschiderea recipienților, se omogenizează conținutul lor și apoi se recoltează cu o lingură sterilă o cantitate de aproximativ 100 g care se trece într-un borcan steril cu dop de sticlă.

Pentru însămînțări se cîntăresc într-o capsulă sterilă 10 g din produs care se trece într-un vas Erlenmayer steril. Se toarnă peste produs 90 ml apă de robinet sterilă și se omogenizează. Se fac diluții decimale din care se fac însămînțări pentru :

a) Bacterii coliforme ;
b) Escherichia coli ;
c) Stafilococ auriu coagulazo-pozitiv ;
d) Drojdii și mucegaiuri.

Pentru Salmonella se cîntărește steril 25 g produs care se omogenizează cu 225 ml mediu pentru preîmbogățire (mediul bulion-manită).

Toate determinările enumerate mai sus se fac folosind metode și mediile obișnuite.

Produsele vegetale congelate trebuie să îndeplinească conform Ordinului Ministerului Sănătății 184/1972 următoarele condiții :

— Bacterii coliforme : maximum 100/g
— Escherichia coli : maximum 10/g
— Salmonella : absent/35 g
— Stafilococ auriu coagulazo-pozitiv : maximum 100/g
— Drojdii și mucegaiuri : maximum 1 000/g

## 4.12.4. Conservate prin acidifiere

Conservarea prin acidifiere este un procedeu care se utilizează la conservarea legumelor și mai rar a fructelor. Acidifierea se realizează cu ajutorul fermentației lactice prin adaosul de acid acetic sau după un prim stadiu de fermentație lactică, se completează prin adaos de acid acetic.

*Recoltarea probelor.* Lichidul în care stau legumele se recoltează cu ajutorul unei pipete sterile 50—100 ml (dacă recipientul cu produse este mai mic), sau cu o sondă metalică specială lungă de 60—80 mm. Lichidul recoltat se trece într-un borcan steril cu dop de sticlă.

Cînd legumele sînt tăiate se recoltează și o cantitate de aproximativ 250 g din acestea.

Transportul și păstrarea probelor se face la temperaturi joase (0—5°C) și într-un timp cît mai scurt.

*Examenul microscopic direct* al saramurii se realizează pentru determinarea numărului de microorganisme printr-o metodă asemănătoare metodei BREED descrisă la lapte și produse lactate.

*Determinarea numărului total al microorganismelor și al bacteriilor acidifiante.* Se fac diluții decimale la produsul de cercetat, după care se procedează la însămînțarea acestuia prin încorporare în mediul geloză cazeină la care s-a adăugat 0,1% glucoză și 0,04 g purpur de bromcrezol. Incubarea se face timp de 3 zile la 32—37°C.

Coloniile bacteriilor acidifiante se dezvoltă colorînd mediul în galben și producînd un precipitat de cazeină. Dacă s-a adăugat mediului și glucoză, atunci se vor controla coloniile prin examen microscopic pentru a le diferenția de drojdii.

Punerea în evidență a coloniilor bacteriilor peptonezante se face după ce s-au numărat celelalte colonii, prin turnarea peste mediu a unei soluții de 5% acid acetic. Aceste colonii apar cu o zonă clară în jurul lor.

*Determinarea prezenței bacteriilor coliforme.* Din diluțiile decimale ale produsului de cercetat se fac însămînțări conform capit. 4.5.3.

*Determinarea prezenței drojdiilor* se face conform punctului 4.14.

Raportul drojdii-bacterii — poate fi un indice al calității legumelor murate. Produsele bune au valori de la 1 : 80 pînă la 1 : 30, iar cele de calitate inferioară proporția de drojdii-bacterii scade între 1 : 3 și 1 : 35.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru determinarea acestui raport se face o numărătoare cu ajutorul unor celule Bürker sau Thomas în preparat proaspăt și apoi se calculează proporția dintre drojdii și bacterii.

*Determinarea titrului hidrogenului sulfurat* ($H_2S$). S-a constatat prin o serie de cercetări că ori de cîte ori se găsește în produsul de fermentație o cantitate mare de bacterii de putrefacție și titrul hidrogenului sulfurat este crescut. În condițiile în care procesul de fermentație decurge normal (în bune condiții), titrul hidrogenului sulfurat este de $10^{-5}$—$10^{-7}$ în primele 4—5 zile, ca apoi să dispară complet în produsul finit.

Determinarea titrului de hidrogen sulfurat se face prin însămînțarea saramurii după o prealabilă neutralizare în mediul bulion-peptonat sau apă-peptonată la care se adaugă cîte o fîșie de hîrtie de filtru îmbibată în soluție 10% acetat de plumb.

Incubarea mediului însămînțat se face timp de 2—5 zile la 37°C. Înnegrirea hîrtiei de filtru indică degajarea de hidrogen sulfurat.

*Determinarea prezenței bacteriilor butirice și a bacteriilor anaerobe de putrefacție*. Punerea în evidență a bacteriilor anaerobe mezofile zaharolitice (butirice) și a celor de putrefacție se face după cum urmează :

— se neutralizează saramura cu carbonat de calciu steril ;
— se inactivează 50—100 ml produs timp de 20 minute la 80°C ;
— se fac diluții decimale ale produsului inactivat ;
— se însămînțează în mediul bulion ficat (dezaerat înainte de întrebuințare și care conține fragmente de ficat) ;
— se toarnă peste mediul însămînțat geloză topită și se răcesc imediat eprubetele la un curent de apă rece ;
— incubarea se face timp de 7 zile la 32—35°C.

Dilacerarea mediului prin producerea de gaze, precum și apariția mirosului caracteristic de acid butiric evidențiază prezența bacteriilor butirice.

Descompunerea fragmentelor de ficat însoțită de prezența unui miros de putrefacție, pune în evidență existența bacteriilor de putrefacție.

*Determinarea prezenței bacteriilor patogene*. Pentru izolarea diferitelor bacterii patogene se va neutraliza mai întîi produsul, după care se va trece la însămînțări după tehnici descrise în capitolele anterioare.

### 4.12.5. Tehnica examenului helmintologic al legumelor și fructelor

Se recomandă examinarea a 10—20 de probe dintr-un lot de legume sau fructe, fiecare probă cuprinzînd 5—10 bucăți, în raport cu volumul respectiv (de exemplu, 5 piese de legume mari sau 10 piese de legume foarte mici). Legumele de cîmp irigat și grădini legumicole se pot transporta în pungi sterile de material plastic.

Tehnica de lucru :

— 5—10 bucăți legume sau fructe sînt introduse în borcane de 1 litru din sticlă cu dop etanș, acoperite cu apă distilată sau ser fiziologic (sau o apă filtrantă lipsită de ouă de geohelminți), timp de 16—24 ore.

— Borcanele astfel pregătite (cu legume și apă distilată) sînt agitate timp de 5 minute, de cîte 4—5 ori.



Scanned with OKEN Scanner

— După 24 ore, legumele sînt spălate într-o nouă cantitate de apă, care se adaugă la apa în care au stat inițial.

— Cantitatea de apă totală, fie că se lasă 24 ore la sedimentare, fie că se centrifughează în cuve mari, timp de 10 minute.

— Supernatantul se îndepărtează prin sifonare ; se analizează sedimentul obținut.

— Sedimentul se examinează în totalitate, la microscop între lamă și lamelă.

— Se centrifughează la 200—300 turații/minut timp de 1—2 minute, îndepărtîndu-se lichidul supernatant, prin decantare.

— Sedimentul obținut după centrifugarea amestecului sediment-hidrat de sodiu, se amestecă cu o soluție saturată de nitrat de sodiu sau potasiu cu D = 1,19. Se efectuează centrifugarea de 5—6 ori, timp de 1—2 minute, de fiecare dată recoltînd peliculele din stratul superficial, cu o ansă în formă de L, de fiecare dată amestecînd conținutul cuvelor cu o baghetă de sticlă. Peliculele recoltate se adună într-o cuvă de centrifugă de 10 $cm^3$, care conține 1 $cm^3$ ser fiziologic sau apă distilată. Se centrifughează 15 minute. Se sifonează supernatantul, iar sedimentul se examinează în întregime la microscop.

## 4.13. ANALIZA VIRUSOLOGICĂ A PRODUSELOR ALIMENTARE

Cercetarea produselor alimentare se efectuează la indicații epidemiologice, locurile de recoltare a probelor și repetarea recoltărilor fiind stabilite de medicul epidemiolog.

Produsele alimentare lichide se recoltează în ambalajele originale proprii sau se toarnă în borcane sterile de 200—300 ml. Produsele alimentare solide se recoltează în cantități de 25—30 g într-o pungă de staniol flambată cu alcool, fiecare fiind atent împachetată. Legumele recoltate se introduc în pungi de polietilenă sau de staniol sterilizate. Pungile de polietilenă se lipesc cu leucoplast. Proba recoltată în staniol se împachetează cu atenție și se etichetează.

### 4.13.1. Prelucrarea probelor de alimente

#### 4.13.1.1. Prelucrarea produselor alimentare lichide (lapte, derivate lactate, acidulate, sucuri)

Prelucrarea se efectuează cu unul din următoarele două procedee, în funcție de reactivii de care dispunem :

*Procedeul 1 :* în proba de produs de 100 ml se adaugă PEG uscat cu pondere moleculară 4 000 sau 6 000 în cantități de 5 g și NaCl uscată în cantitate de 1,82 g ; ingredientele se dizolvă ușor agitînd manual fla-



Scanned with OKEN Scanner

conul ; după dizolvarea ingredientelor se lasă proba în repaus la temperatura de +4°C timp de 1 oră, apoi se centrifughează la 3 000 t/min timp de 10 minute, iar lichidul supernatant se îndepărtează ; se obține un sediment în cantitate de aproximativ 25 g. În continuare se procedează ca pentru produsele alimentare semisolide.

*Procedeul 2 :* proba de produs de 100 ml se adaugă 0,3 g citrat de sodiu ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5{,}5\ H_2O$) ; lichidul din balon se amestecă într-un agitator magnetic timp de 20 minute, apoi se adaugă 10 ml freon 113 cu pondere moleculară 1,36 și se omogenizează amestecul de ingrediente la 4 000—5 000 t/min timp de 1—2 minute ; omogenatul se centrifughează la 3 000 t/min timp de 30 minute ; lichidul supernatant, cu un aspect ușor opalescent, se trece într-un balon steril, se purifică de flora microbiană cu freon 113 sau cu eter etilic și se conservă la —20°C pînă la inocularea pe gazde de laborator.

### 4.13.1.2. Prelucrarea produselor alimentare semisolide (brînzeturi, smîntînă, semifabricate de carne și pește, pîine)

Extracția particulelor virale în faza lichidă și decantarea probei se poate face prin unul din următoarele două procedee :

*Procedeul 1 :* proba de produs alimentar în cantitate de 25 g se introduce într-un balon steril de 250 ml se adaugă 100 ml 0,1 M soluție de tampon-glicol pH 8,8. Balonul cu lichid se agită într-un agitator timp de 5 minute ; după depunerea sedimentului la temperatura de 4°C timp de 15 minute, lichidul supernatant se filtrează printr-o pîlnie cu vată de sticlă aplicînd presiune pozitivă sau negativă de 0,5 atmosfere ; filtrul este folosit pentru concentrarea particulelor virale, după cum vom arăta în continuare.

*Procedeul 2 :* proba de aliment în cantitate de 25 g se introduce într-un pahar steril în vederea omogenizării ; se adaugă 25 ml 0,5 M tampon fosfat pH 8,2 sau 0,1 M soluția tampon glicol pH 8,8 (tamponul glicol se folosește pentru produsele mai acide : smîntînă, brînză de vaci, pîine) ; totodată, se mai adaugă în probă 25 ml freon 113 și 0,5 g clorură de magneziu uscată ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$) ; proba se omogenizează la 4 000—8 000 t/min timp de 2 minute ; omogenatul este apoi centrifugat la 3 500 t/min timp de 30 minute ; lichidul supernatant are un aspect transparent ușor opalescent ; în cazul în care este tulbure se repetă tratarea cu freon 113 fără a se mai adăuga tamponul și clorura de magneziu ; sedimentul este înlăturat ; lichidul supernatant se transferă într un flacon de 50 ml urmînd a fi folosit pentru concentrarea particulelor virale cu PEG.

### 4.13.1.3. Prelucrarea produselor alimentare solide (crupe, carne, unele brînzeturi etc.)

La o probă de produs de 50 g se adaugă 100 ml 0,1 M soluție de tampon glicocol pH 8,8 sau 100 ml 0,5 M soluție tampon fosfat pH 8,2.



Scanned with OKEN Scanner

Balonul cu lichid și produsul se agită la agitator timp de 20 minute ; se lasă proba să se sedimenteze la temperatura de +4°C timp de 15 minute apoi lichidul supernatant se filtrează prin pîlnia cu vată de sticlă ; filtratul este folosit pentru concentrare.

#### 4.13.1.4. Prelucrarea probelor de legume

*Desadsorbția particulelor virale de pe suprafața legumelor în faza lichidă.* 4—5 rădăcinoase, constituind o probă, se introduc într-un borcan steril cu gîtul larg cu capacitate de 1 litru ; se toarnă 100 ml soluție tampon fosfat pH 8,2, se acoperă la gură cu staniol steril și se agită manual timp de 5 minute ; lichidul este separat și centrifugat la 3 000 t/min timp de 20 minute ; sedimentul se înlătură ; lichidul supernatant se debarasează de flora microbiană cu ajutorul freonului 113 sau eterului etilic și poate fi folosit pentru inoculare pe gazde de laborator, sau concentrare cu ajutorul filtrării sau sedimentării cu sulfat de aluminiu.

### 4.13.2. Concentrarea particulelor virale din produse alimentare

Concentrarea se poate realiza, de la caz la caz și în funcție de reactivii de care dispunem, cu ajutorul PEG, a filtrării sau a sedimentării cu sulfat de aluminiu.

#### 4.13.2.1. Concentrare cu PEG

La extract se adaugă PEG cu pondere moleculară 4 000—6 000 pînă la obținerea concentrației de 10% și clorură de sodiu uscată (NaCl) pînă la obținerea soluției de 0,5 M.

Proba este agitată manual timp de 1—2 minute pînă la dizolvarea completă a ingredientelor și menținută la +4°C timp de 60 minute, apoi centrifugată la 3 000 t/min timp de 15 minute ; lichidul supernatant se scurge atent și se înlătură ; sedimentul se resuspendă în 2 ml soluție Earle pH 7,6 sau în 2 ml soluție Hanks pH 7,4.

#### 4.13.2.2. Concentrare cu ajutorul filtrării din produse alimentare

*Pregătirea instalației de filtrare :* filtrul din material FP (URSS) este introdus în fixatorul Seitz sau într-un oricare alt fixator de filtru ; filtrul se aplică pe sită cu oricare suprafață deoarece ambele părți sînt la fel ; diametrul filtrului poate fi egal cu 3,0—14,0 cm.

*Filtrarea :* proba lichidă este trecută prin filtru cu ajutorul unei presiuni pozitive sau negative de 0,5 atmosfere ; după ce tot lichidul a trecut prin filtru, filtrul este scos din fixator cu o pensă sterilă și depus într-o placă Pétri sterilă.

*Eluția :* peste filtru din Pétri se toarnă soluție de NaCl 1 M (eluentul) calculînd cîte 2 ml de lichid peste 10 $cm^2$ de suprafață a filtrului (adică 2 ml de eluent pentru un filtru cu diametrul de 3 cm) ; filtrul este spălat



Scanned with OKEN Scanner

agitînd lichidul timp de 2—3 minute, procedeu care realizează eluția particulelor virale ; lichidul este adunat într-un flacon (eluatul primar), apoi se toarnă peste filtru o nouă cantitate de eluent, de același volum și se repetă procedeul de eluție a particulelor virale de pe filtru (eluatul secundar) ; cele două eluate se unesc și se trece la purificarea probelor de flora microbiană cu ajutorul freonului 113 sau a eterului etilic și la inoculare pe gazde de laborator.

### 4.13.2.3. Concentrare cu ajutorul sedimentării cu sulfat de aluminiu

*Sedimentarea particulelor virale :* se ridică temperatura lichidului la +20°C în baie marină ; la 1 litru de lichid se adaugă 2 ml de soluție 10% de sulfat de aluminiu $(Al_2SO_4)_3$ ; se amestecă bine cu ajutorul mixerului electric (de orice marcă) ; se ajustează pH-ul la 5,4—5,8 adăugînd cu picătura 1 M soluție HCl sau 1 M soluție NaOH.

*Prelucrarea sedimentului :* se lasă lichidul la temperatura camerei timp de 4 ore sau la +4°C timp de 18 ore pentru sedimentarea flocoanelor ; lichidul supernatant se îndepărtează cu ajutorul pompei aspiratoare sau scurgînd cu atenție peste marginea vasului ; sedimentul se trece într-un pahar de centrifugă și se centrifughează la 2 000 t/min timp de 10—15 minute.

*Eluția particulelor virale* : lichidul supernatant se îndepărtează, iar sedimentul se resuspendă în 3—5 ml soluție Hanks, pH 7,4 ; în ziua inoculării pe gazde de laborator (culturi celulare și șoarece nou-născut), eluatul este centrifugat la 2 000 t/min timp de 15 minute îndepărtîndu-se lichidul supernatant ; sedimentul se resuspendă în 4 ml soluție Hanks pH 7,4 conținînd 1 ml penicilină 1 000 unit., 1 mg streptomicină, nistatin 1 000 unit. ; se ajustează pH-ul eluatului la 7,0—7,3 cu ajutorul 1 M soluție HCl sau 1 M soluție NaOH. Ca eluenți, pe lîngă soluția Hanks se mai pot folosi bulion peptonat 0,5 M soluție tampon fosfat pH 8,2 ; urmează purificarea materialului de flora microbiană cu ajutorul freonului 113 sau a eterului etilic.

Atenție ! Probele tratate cu săruri de aluminiu se păstrează numai la temperatura de +4°C, fără congelare.

## 4.13.3. Purificarea materialului de flora microbiană

Purificarea materialului de flora microbiană se face cu ajutorul freonului 113 sau a eterului etilic.

a) *Cu ajutorul freonului 113 :* la 150 ml freon 113 (1, 1, 2-triclor-trifluoretan) se adaugă 63 ml n-heptan ajustînd astfel greutatea specifică a freonului la 1,36 ; se amestecă o parte din lichidul de purificat cu 3 părți freon cu pondere specifică de 1,36 ; se agită proba energic manual, sau la agitator 5 minute ; se aspiră faza lichidă atent cu o pipetă și se trece



Scanned with OKEN Scanner

într-un tub de centrifugă ; se centrifughează la 5 000 t/min timp de 20 minute ; supernatantul se trece într-un flacon steril și se astupă cu dop de cauciuc.

b) *Cu ajutorul eterului etilic :* la lichidul prelucrat se adaugă un volum egal de eter etilic ; se amestecă bine eterul prin pipetarea lichidului cu o pipetă de 5 ml cu pară de cauciuc ; după ce s-a format o suspensie omogenă, se pune dop de cauciuc și se lasă lichidul în repaus la temperatura de +4°C peste noapte ; a doua zi, dopurile de cauciuc se înlocuiesc cu cele de tifon, lichidul se centrifughează la 3 500 t/min timp de 20 minute ; se formează două straturi de lichid și la limita dintre ele un inel de substanță grăsoasă ; trecînd cu vîrful pipetei prin acest inel, se aspiră cu atenție lichidul de la fund și se trece în plăci Pétri ; plăcile rămîn parțial deschise (de preferat în nișă) și din timp în timp clătinate ; peste 1—2 ore, cînd eterul s-a evaporat, ceea ce se simte prin dispariția mirosului caracteristic al eterului, lichidul este trecut în flacoane sterile ; în cazul unei impurificări însemnate cu floră microbiană a materialului de cercetat, procedeul de purificare se repetă de două ori, sau după primul ciclu de purificare, se adaugă antibiotice în cantitate de 1 000 unități penicilină, 1 000 mg streptomicină la 1 ml lichid.

Probele astfel prelucrate se conservă la —20°C pînă la inoculare pe gazde de laborator.

În afară de metodele descrise aici pentru analiza virusologică a produselor alimentare, recomandate și de Ministerul Sănătății al U.R.S.S. (1982) în vederea aplicării lor în teren, au mai fost experimentate și alte metode, care pot fi consultate în literatura de specialitate (Zavate și Cajal, 1983) și aplicate în mod particular la anumite alimente, cum ar fi carnea, scoicile etc.

## 4.14. ANALIZA MICOLOGICĂ A ALIMENTELOR

### 4.14.1. Examen micologic cantitativ

*Principiu :* Se admite că din fiecare celulă de mucegai sau de drojdie viabilă într-un produs alimentar se dezvoltă cîte o colonie tipică distinctă, în condiții adecvate de cultură, și pe această bază se calculează numărul probabil, diferențiat și total, de mucegaiuri și drojdii (NPM ; NPD ; NPMD) raportat la un gram sau ml de aliment controlat.

#### 4.14.1.1. Recoltarea probei

Recoltarea probei se efectuează în conformitate cu specificările actelor normative aferente produsului alimentar de controlat, asigurînd caracterul ei reprezentativ, menținerea proprietăților pînă în momentul ana-



Scanned with OKEN Scanner

lizării, precum și condițiile riguros aseptice. La produsele alimentare cu suprafața mucegăită se îndepărtează ușor stratul superficial și se recoltează din profunzime.

### 4.14.1.2. Pregătirea probei în vederea analizei micologice

Din proba recoltată din stratul superficial sau din profunzime, în cazul produselor semi-solide, solide sau pulberi se cîntăresc aseptic 10 g. În cazul produselor lichide sau a celor care se pot topi la 37—40°C se pipetează 10 ml, după o prealabilă agitare. Cele 10 g aliment se solubilizează cu 90 ml ser fiziologic peptonat 0,1% sau soluție citrat de sodiu 2%, și se mojarează cu nisip steril pentru obținerea diluției $10^{-1}$. Se recomandă, în mod particular ca diluant, soluția de citrat de sodiu 2% (soluție caldă la aproximativ 40°C) pentru produsele lactate bogate în calciu (brînzeturi preparate din caș, lapte praf etc.). Pentru făinurile vegetale (grîu, porumb, soia) sau pentru cereale boabe se prelevă 10 g din probă, dar agitarea cu 90 ml ser fiziologic peptonat 0,1% se face într-un cilindru gradat sau în lipsa acestuia într-un pahar Erlenmayer (agitare favorizată cu perle de sticlă, eventual) ; apoi sedimentare cca 15—20 minute și reținerea supernatantului.

### 4.14.1.3. Determinarea numărului de mucegaiuri (levuri) și drojdii

Din alimentele lichide, omogenizate prin agitare, se ia 1 $cm^3$ și se introduce într-o eprubetă cu 9 $cm^3$ ser fiziologic peptonat. Se continuă diluțiile decimale succesive.

În cazul produselor solide se pornește de la diluția 1/10 în prealabil pregătită în mojar sau Erlenmayer (vezi pregătirea probei în vederea analizei micologice). Se continuă diluțiile decimale succesive. Se recomandă în cazul produselor lactate bogate în calciu (brînzeturi, lapte praf) utilizarea ca diluant a soluției de citrat de sodiu 2%.

În cazul analizei micologice a untului, pe tot timpul lucrului se ia precauțiunea ca materialele (pipete, eprubete, lichidul de diluție, plăcile Pétri) să fie calde la 40—45°C. Întotdeauna trebuie respectată precauția de schimbare a pipetei la fiecare diluție.

Numărul de diluții care se efectuează pentru un anumit produs alimentar va fi suficient de mare și în funcție de nivelul presupus al contaminării probei de analizat.

**ÎNSĂMÎNȚAREA**

Din fiecare diluție se introduce cîte 1 ml în două cutii Pétri. În fiecare cutie Pétri se vor introduce 10—15 ml mediu lichefiat și adus la 45°C.



Scanned with OKEN Scanner

**INCUBAREA**

Cutiile Pétri cu mediul însămînțat se țin la temperatura camerei (22—24°C), timp de 5 zile.

**NUMĂRAREA COLONIILOR**

Numărarea coloniilor (cu ochiul liber sau preferabil cu lupa) se efectuează de obicei în plăcile în care s-au dezvoltat 10 . . . 100 colonii, folosind eventual un fond negru pentru sesizarea contrastului.

Se numără mucegaiurile și drojdiile, înregistrîndu-se separat, apoi ținîndu-se seama de diluție se calculează numărul de mucegaiuri/1 g sau numărul de drojdii/1 g produs analizat.

Morfologia tipică a coloniilor de mucegaiuri se poate confirma prin examen cu lupa, iar a coloniilor de drojdii prin examen microscopic pe frotiuri colorate obișnuit (cu albastru de metilen) pentru diferențierea de eventuale rare colonii bacteriene neinhibate în condițiile de cultivare utilizate.

## 4.14.2. Examen micologic calitativ

### 4.14.2.1. Identificarea morfologică a coloniilor de mucegaiuri

a) *Examen macroscopic :* pe colonii de o săptămînă — în placa inițială sau de preferință reținerea de colonii izolate prin repicare pe mediul Czapek-Dox pH 6.

Urmărim topografia generală (netedă, reliefată, neregulată, vălurită etc.) ; urmărim în special textura (levuriformă, sau dimpotrivă la mucegaiuri foarte diferită după gen ; pufoasă, catifelată, prăfuită, vătoasă etc.).

Urmărim ritmul de creștere (rapid sau lent) a coloniilor de mucegaiuri. Urmărim, de asemenea, *pigmentarea :* puncte colorate (de obicei sporangi), ori umede, pigmentarea de suprafață sau deseori, zone de pigment difuzibil în profunzime.

b) *Examinarea la lupa binoculară :* prin observația în detaliu a aparatului vegetativ și aparatului de reproducere a mucegaiurilor, se poate pune *diagnostic de gen.*

Hifele care alcătuiesc miceliile constau fie din celule alipite (micelliu septat), fie unicelular-neseptat (coenocitic la clasa Phycomycetes). Organizarea septată a hifelor este caracteristică mucegaiurilor mai evoluate din clasele Ascomycetes, Basidiomycetes și Fungi imperfecți.

Aparatul de reproducere a mucegaiurilor cuprinde spori asexuați sau sexuați. Sporii asexuați, cel mai frecvent observați la mucegaiuri, sînt foarte diferiți : sporangiospori (caracteristici pentru Rhizopus), conidiile (caracteristice pentru clasa Ascomycetes, dar foarte diferit dispuse la genul Aspergillus față de genul Penicillium, de exemplu), chlamidospori, artrospori etc.



Scanned with OKEN Scanner

c) *Examinarea microscopică :* se raclează cu ansa (de preferat ansă-ac) o mică porțiune de colonie, se pune într-o picătură de lugol sau de lactofenol Aman, se examinează cu obiectivele 10, 20, 40 pentru a observa spori sau alte structuri de diagnostic. *Identificarea* de colonii de mucegaiuri cu morfologie caracteristică mai ales din genurile *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Rhizopus, Mucor* etc. și de drojdii din genul Candida, trebuie să reținâ în mod deosebit atenția datorită potențialului lor micotoxigen bine cunoscut, în vederea determinării lui eventuale ulterior.

### 4.14.2.2. **Examinarea drojdiilor** (levurilor)

a) *Examen microscopic* pe frotiuri colorate obișnuit (cu albastru de metilen). Se observă forma sferică, ovalară, sau alungită ; monomorfismul sau polimorfismul. Mărimea celulelor este mult superioară bacteriilor. Volumul celulelor de levuri poate varia între 20—50 $\mu^3$ (la bacterii 1—6 $\mu^3$). Au organizare celulară de tip eucariot.

b) *Examinarea caracterelor biochimice și de metabolism.* Auxonograma pentru surse de azot, auxonograma pentru surse de carbon, fermentarea zaharurilor (zimograma) etc. Pentru identificarea drojdiilor se ține seama și de legile de fermentație, care în plus permit verificarea purității tulpinei : (I) orice levură care nu fermentează glucoza nu fermentează nici un alt zahăr și deci nu elaborează zimaze ; (II) orice levură care fermentează glucoza fermentează de asemenea fructoza (levuloza) și manoza, de unde inutilitatea testării acestora ; (III) nici o levură nu poate fermenta și maltoza și lactoza, ci numai pe una dintre ele. Rezultă că cercetarea glucozei este indispensabilă pentru testarea capacității fermentative și că zimograma se reduce la cinci zaharuri, maximum șase : glucoza, galactoza, maltoza, lactoza, rafinoza, zaharoza.

### 4.14.2.3. **Metodă rapidă pentru selectarea tulpinilor prezumtiv aflatoxinogene de mucegaiuri**

*Principiu :* examinarea pigmentogenezei și fluorescenței în ultraviolete, caracteristică tulpinilor fungice aflatoxinogene, poate fi exploatată, într-un mediu de cultură selectiv, ca un criteriu diferențial pentru selectarea tulpinilor prezumptiv aflatoxinogene. Se urmăresc colonii din genul Aspergillus și genul Penicillium.

Se pot utiliza două variante de cultivare : mediul STAS agar Czapek-Dox (fără tetraciclină) și mediul Czapek modificat de F. Jantea și colab., la care sursa de azot este asigurată de fosfatul diacid de amoniu — $(NH_4)H_2PO_4$ — 10 g‰. Incubarea plăcilor se face timp de 7 zile la temperatura camerei (22—24°C).

*Selectarea tulpinilor prezumtiv aflatoxinogene* se efectuează după fluorescența albastră-violacee (blue) sau verzui-gălbuie (green) emisă de colonie sau de haloul ei în raze ultraviolete la lungimea de undă aproximativ 356 nm (filtre $BG_{12}$ — 1,5 mm și $UG_1$ — 2,5 mm) la microscop IOR MC-1 ; sau cu ajutorul unei surse de iradiere U.V. și filtrare cores-



Scanned with OKEN Scanner

punzătoare (lampă U.V.-H.B.O.). Recomandăm folosirea la acest examen micologic selectiv în special a mediului Czapek modificat, cu sursă de azot $(NH_4)H_2PO_4$ — 10%, avînd în vedere creșterea posibilității de selectivitate (crește intensitatea fluorescenței în U.V.).

Tulpinile prezumtiv aflatoxinogene selectate prin această metodă rapidă, apar ca fiind producătoare de aflatoxină în proporție de aproximativ 75% prin metode chimice.

Confirmarea chimică s-a făcut după însămînțarea tulpinilor prezumtiv aflatoxinogene în mediul Czapek-Dox lichid determinînd aflatoxinele produse în acest mediu după 10 zile de incubare la temperatura camerei, prin extracția aflatoxinelor în cloroform și cromatografierea în strat subțire pe silicagel G a extractului purificat și concentrat.

### 4.14.2.4. Identificarea morfologică a coloniilor de mucegaiuri diagnostic de gen – prezentată în figuri

În figurile 12—26 sînt prezentate unele genuri de mucegaiuri ce pot contamina mai frecvent alimentele și mediul înconjurător : Genul Penicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Fusarium, Helmintosporium, Alternaria, Oospora, Cladosporium, Monilia sitophila, Gliocladium, Trichotecium, Cephalosporium, Trichoderma, Scopulariopsis.

Identificarea genurilor se bazează pe examinarea macroscopică a coloniei de mucegaiuri (urmărind ritmul de creștere, topografia generală, culoarea, pigmentarea), urmată de examinarea la lupa binoculară și examinarea microscopică, ce este în detaliu prezentată în figuri.

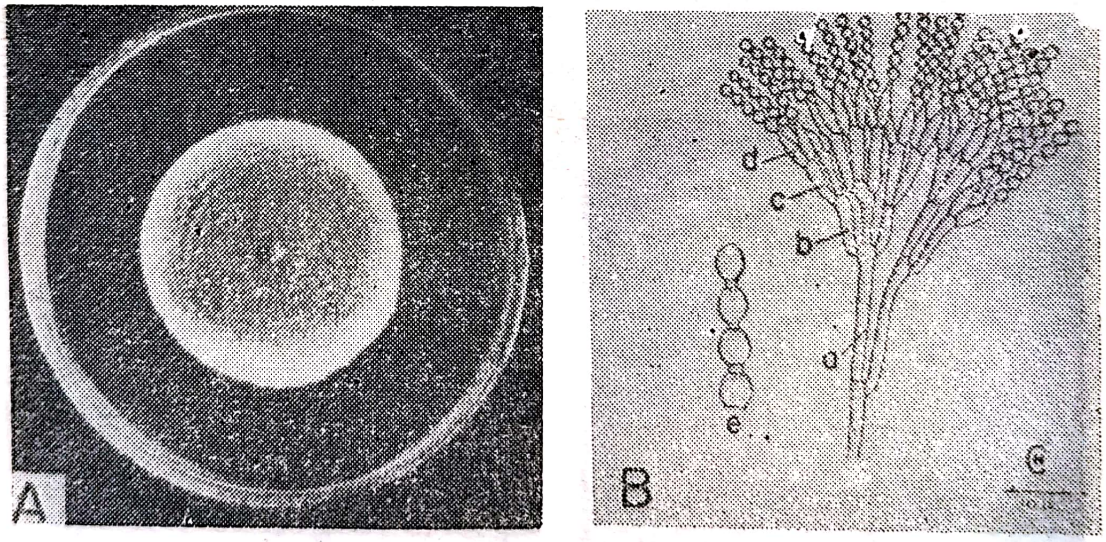



*Fig. 12* — Genul Penicillium (clasa Ascomycetes) :
A — colonii care cresc rapid (50 mm în 8 zile) la început albe, apoi devin albăstrui-verzui, foarte prăfoase datorită abundenței producției de spori din miceliul aerian
B — hifele purtătoare de spori formează un aspect tipic de „penicillius" sau de „mătură" — conidiile eliptice (e) apar în lanțuri ramificate, rezultate din celule speciale cu aspect de umflături — sterigme (d) care provin din capetele metulelor (c) rezultate din ramurile (b) conidioforului (a).



Scanned with OKEN Scanner

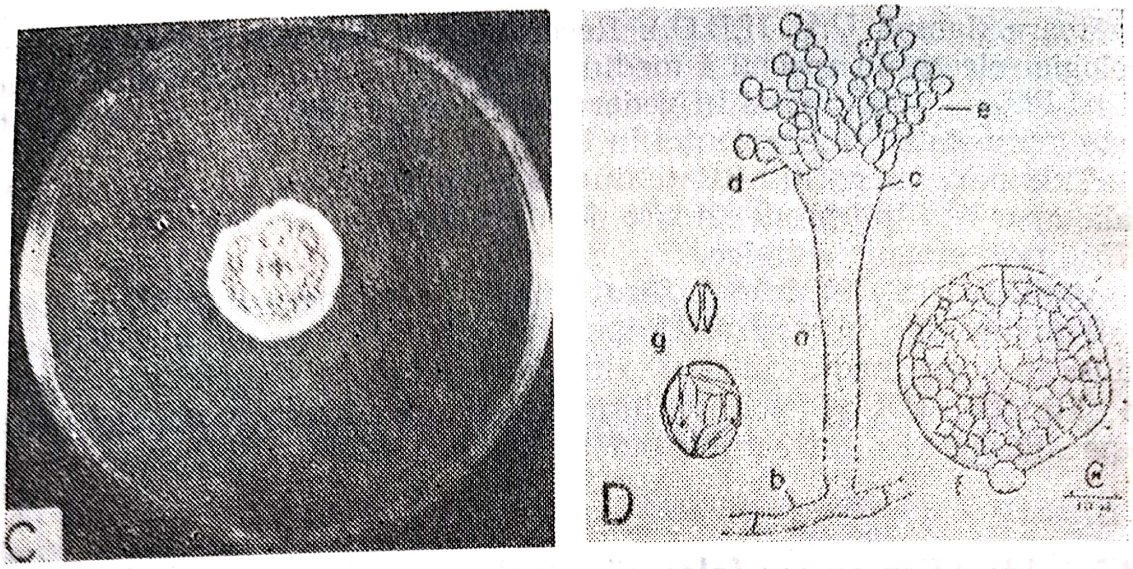



*Fig. 13* — Genul Aspergillus (clasa Ascomycetes) :
C — colonii compacte care cresc lent (28 mm în 8 zile) la început albe, apoi albăstrui-vrezui cu arii galbene ca sulful răspîndite pe suprafață ;
D — structura care poartă conidiile este o hifă neramificată, neseptată, alungită (a) rezultată dintr-o celulă picior a miceliului (b). Ea se lărgește la vîrf, formînd o veziculă (c) din care apar sterigmele (d). Conidiile (e) se dezvoltă din sterigme, formînd lanțuri neramificate și dînd aspectul neregulat, rugos al umflăturii apicale conidioforului.
Unele specii de Aspergillus dezvoltă perithecie ascocarp de formă sferică (f), conținînd asce cu ascospori (g).

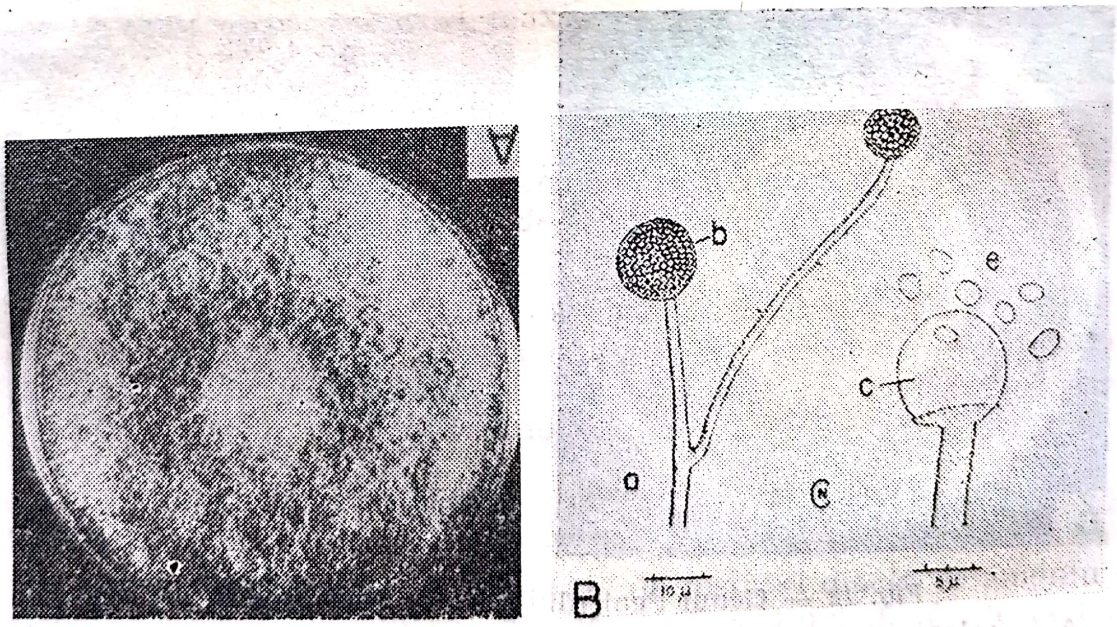



*Fig. 14* — Genul Mucor (clasa Phycomycetes) :
A — creștere fungică rapidă, umple placa Pétri în 5 zile cu un miceliu aerian flocos, la început alb apoi gri închis.
B — miceliul vegetativ neseptat dă naștere la numeroși sporangiofori (a) neegali ca mărime, care se ramifică neregulat și poartă la capăt sporangiul (b), globulos plin cu spori. Peretele sporangiului se rupe ușor (c) eliberînd sporii eliptici (e).



Scanned with OKEN Scanner

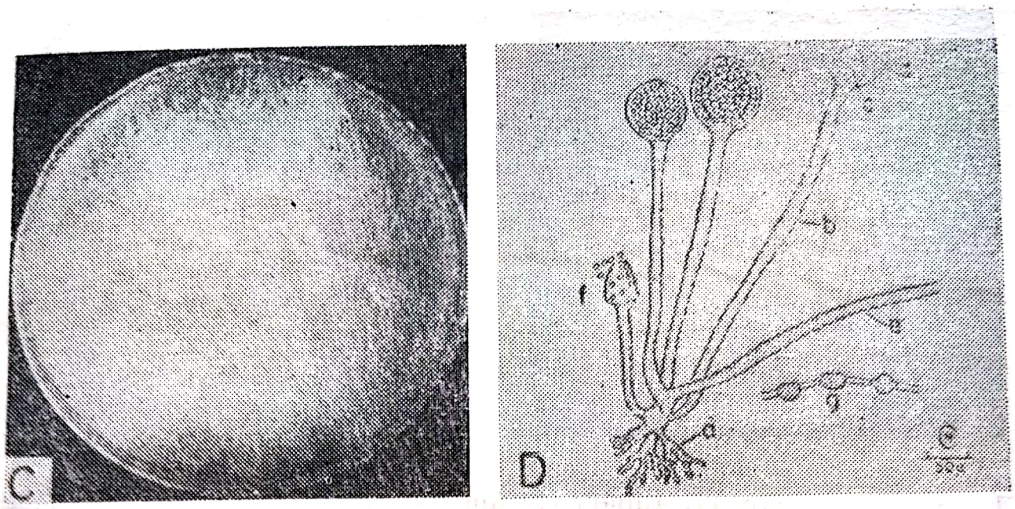



*Fig. 15* — Genul Rhizopus (clasa Phycomycetes) :
C — creștere fungică rapidă. Umple placa Pétri în 5 zile cu miceliul dens ca vata la început alb, apoi gri închis.
D — miceliul vegetativ neseptat dă naștere la numeroși sporangiofori neramificați (b), terminați cu sporangii (d) negri, globuloși, plini de spori. Între miceliile aeriene neseptate se găsesc numeroși stoloni (c) care conectează fasciculele sau grupele neramificate de spongiofori. La punctele de contact ale stolonilor cu suprafețe (mediu ori sticlă) apare un smoc de hife asemănătoare rădăcinilor, numite rizoizi (a). Partea globuloasă, terminală a sporangioforului, numită columela (e), se extinde în sporangiu și este clar vizibilă (f) cînd peretele sporangiului este rupt.

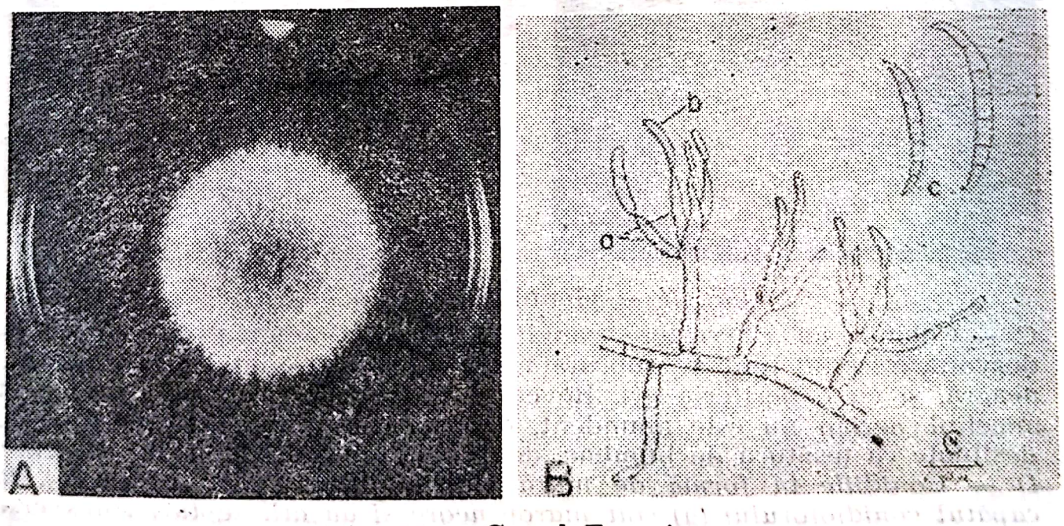



*Fig. 16* — Genul Fusarium :
A — colonii care cresc rapid (45 mm în 5 zile), la început albe ca vata ,apoi devin roz închis în centru care apare umbrit în raport cu periferia de aspect roz luminos ;
B — Ramuri de hife scurte se ridică din miceliul vegetativ dînd conidiofori verticilați (a) care poartă conidii (c) lungi fusoide ori cu aspect de secetă, ascuțite la capăt (c), multiseptate, specifice genului



Scanned with OKEN Scanner

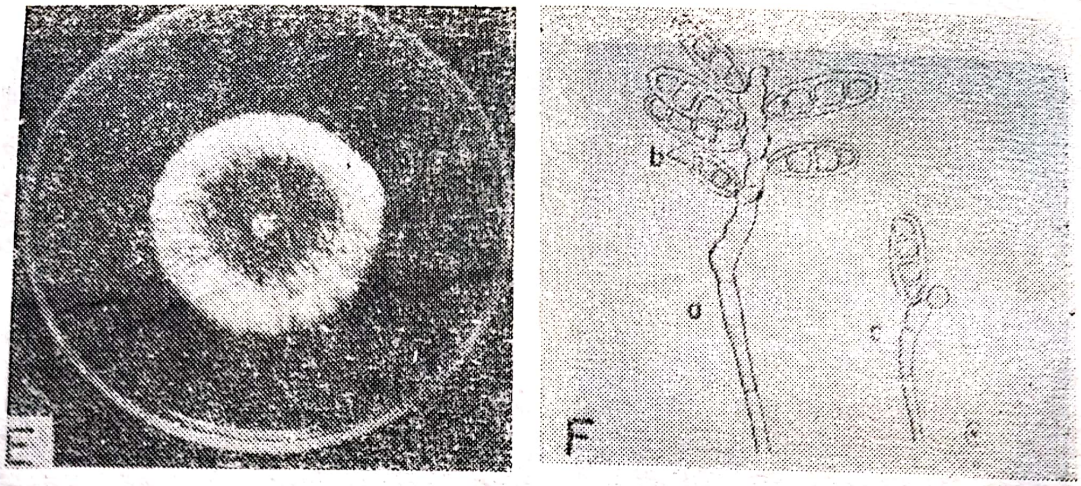



*Fig. 17* — Genul helmintosporium :

E — Colonie cu creștere rapidă (40 mm diametru în 5 zile) este la început de culoare gri, pentru ca apoi să formeze un miceliu, mat negru cu depresiune centrală și cu periferie cu raze gri.

F — Conidiile apar în ciorchine pe conidioforele scurte grupate (a), *conidiile sînt lungi, ovale, cu cîteva septuri transverse (b).* Conidioforele se dezvoltă ca o ramură din miceliu, devin umflate la capăt și produc un singur conidiu pe una dintre părți, puțin dedesubtul vîrfului (c). Conidioforul continuă să se lungească de la vîrf și produce alte conidii pînă cînd se dezvoltă conidioforul tipic (a). Detașarea conidiilor dă conidioforului un aspect nodular și răsucit cu zone închise în locurile în care se atașează conidiile. Miceliul, conidioforele și conidiile sînt la culoare maron închis.

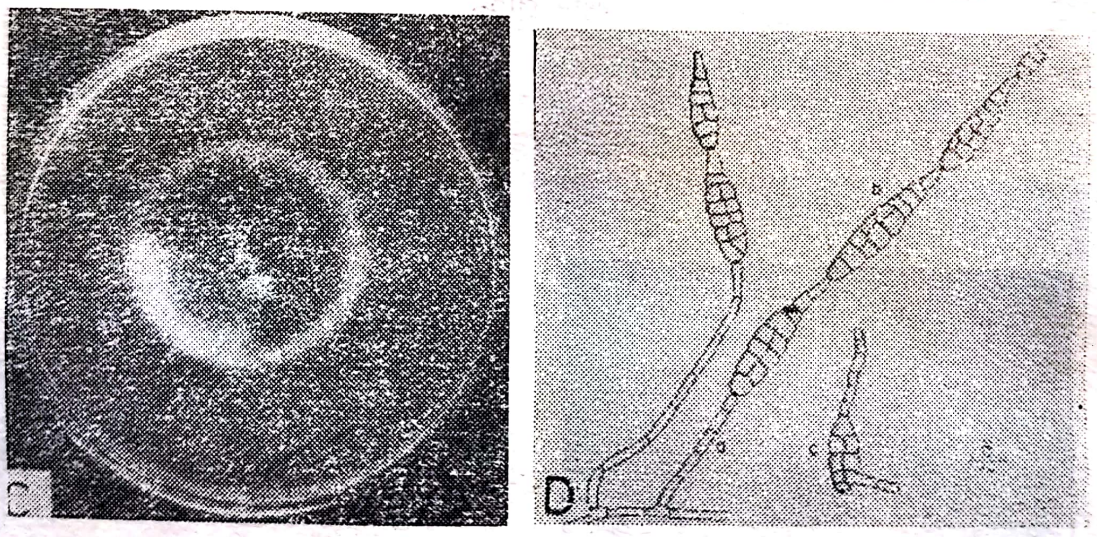



*Fig. 18* — Genul Alternaria sp. :

C — Colonia cu o creștere rapidă (40 mm diametru în 4 zile) își dezvoltă miceliul lipit de suprafața agarului la început gri, apoi devine neagră, și cu o periferie gri. Reversul coloniei este negru. La început miceliul aerian nu este abundent, dar apoi suprafața de miceliu alb, deslînate ca țesătura de bumbac, devin slab-murdare pînă la gri-negre.

*D — Conidiile în formă de mură sînt înlănțuite cap la cap (b), la capătul conidioforului (a) sînt maron-negre și au atît septuri transverse cît și longitudinale.* Fiecare celulă de conidiu poate produce un mugure — tub germinativ (c). Fiecare conidiu produs prin înmugurire unul și altul, este prelungit, cu un cioculeț de obicei și are la punctul de inserție o pată neagră. Fiindcă sporii sînt produși în succesiune acropetală se formează adesea lanțuri ramifilate. Ocazional conidiile muriforme pot fi rotunjite și nu formează lanțuri sugerînd aspect de Macrosporium.

Unii autori consideră genul Alternaria sinonim cu Stemphylium.



Scanned with OKEN Scanner

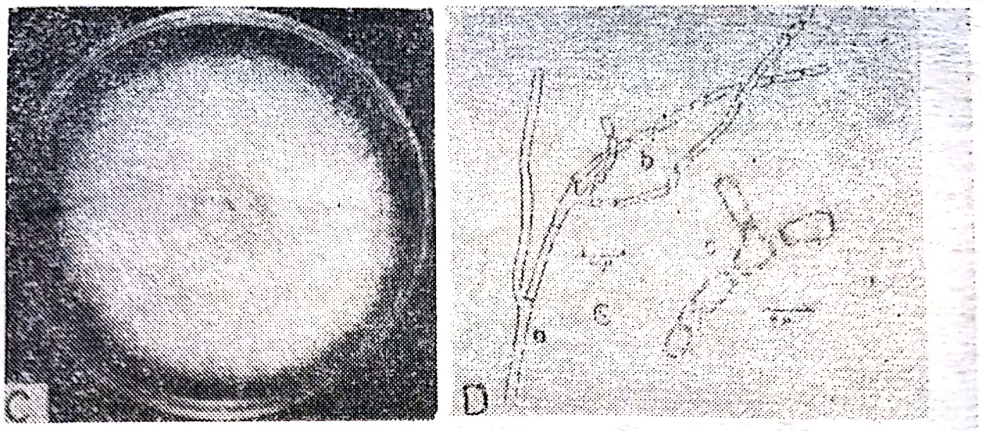


*Fig. 19* — Genul Oospora sp. :

C — Colonia se dezvoltă rapid (90 mm diametru în 6 zile) producînd un micelіu aerat, linos, de culoare deschisă (culoarea pielii) ;

D — Hifele sînt lungi, suple (a) se întrerup pentru a forma celule dreptunghiulare cu perete subțire (b) în care sînt cuprinși sporii (c). Se pare că nu e satisfăcătoare clasificarea fungilor care se reproduc prin fragmentarea miceliului. Genurile Oidium și Oospora sp. au fost folosite în general pentru a desemna paraziții obligatori ai Ascomycetelor, precum și alți fungi strict saprofiți. Atît Oidium cît și Oospora *se reproduc prin fragmentarea bufelor lor.* În literatura medicală fungii asemănători cu drojdiile și care se reproduc prin fragmentare, sînt de obicei plasați în *genul Geotrichum.*

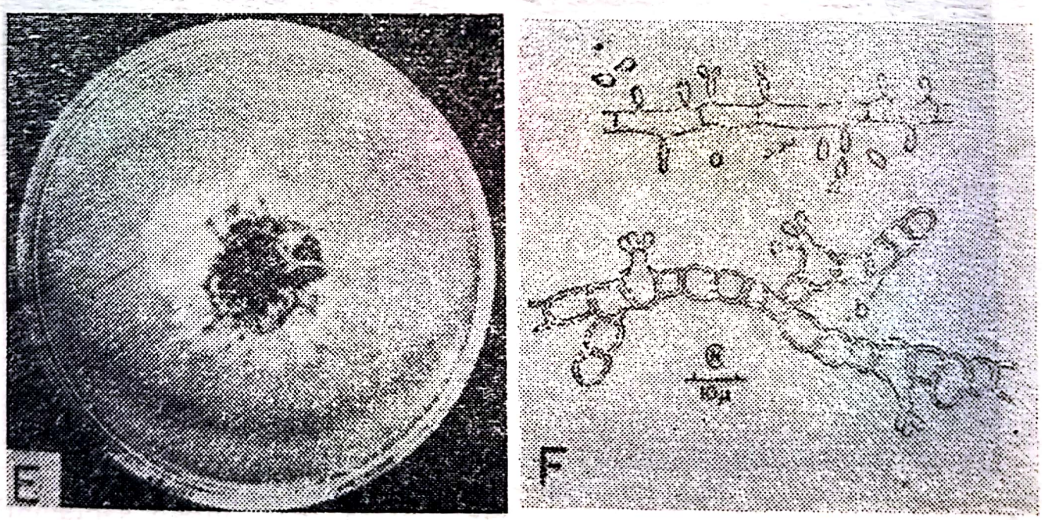


*Fig. 20* — Genul Cladosporium (Dermatium)* :

E — se dezvoltă lent în colonii zbîrcite, negre, strălucitoare, umede cu margini gri franjurate (levuriforme) ;

F — Miceliul este alcătuit din celule (a, b) lungi delicate cu pereți subțiri. Unele din ele germinează formînd tuburi scurte din care imediat înmuguresc cîteva conidii mici, piriforme (c). Aceste conidii pot să înmugurească producînd o masă de material lucitor pe suprafața culturii

* Unii autori consideră genul Dermatium sinonim cu genul Cladosporium, fiind identice macroscopic, deși microscopic există unele deosebiri. La punctul F din figură este reprezentată microscopia genului Dermatium.



Scanned with OKEN Scanner

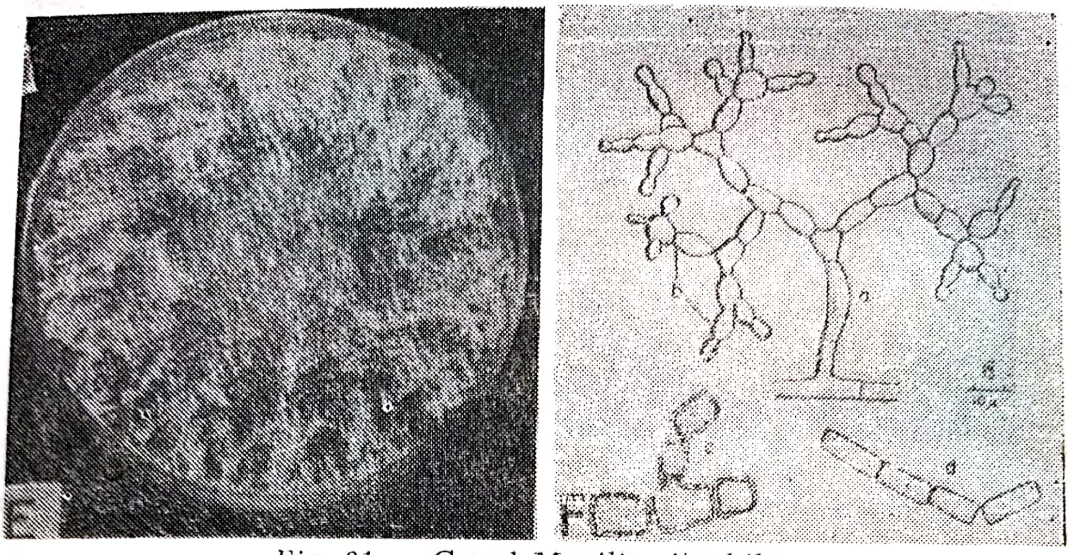


*Fig. 21* — Genul Monilia sitophila :

E — cultură rapid crescătoare, umple placa Pétri în cîteva zile. Ea este albă la început, acoperă în strat subțire suprafața agarului, dar dezvoltă apoi *suprafețe scămoșate* (de culoarea somonului *pătate*) datorită producerii masive de spori. *Creșterea extrem de rapidă* permite sporilor să umple aerul cînd se descoperă Pétri-ul și rămîne ca un contaminant nedorit ;

F — Conidioforul (a) provine din miceliu și produce imediat lanțuri ramificate (b) de conidii ovoide prin continuă înmugurire. Această producere de spori prin înmugurire, eventual dezvoltă mase mari de conidii ovoide care sînt ușor disociate și rapid dispersate de curenți de aer. Porțiunile cele mai vechi ale miceliului vegetativ se rup în dreptul septurilor (c) și (d) formînd artrospori cu pereți groși.

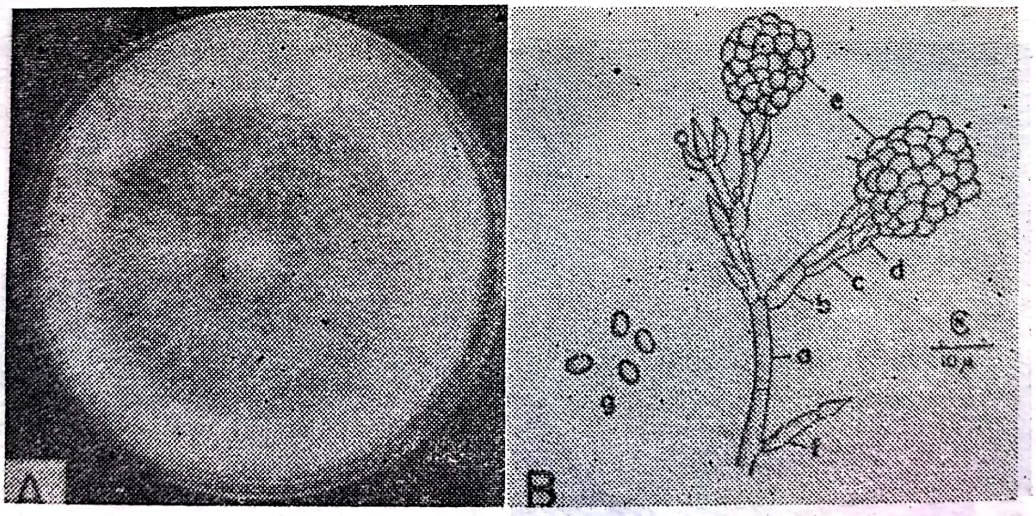


*Fig. 22* — Genul Glicoladium :

A — cultura rapid crescătoare, umple placa Pétri într-o săptămînă. Ea este la început albă, dar apoi dezvoltă o zonă centrală verde închis, care se împrăștie rapid pe suprafața coloniei. Este un fung mai repede crescător decît Aspergillus și Penicillium cu care seamănă oarecum microscopic ;

B — Hifele purtătoare de conidii formează un tipic „penicillus" ca la Penicillium. De la conidiofor (a) se dezvoltă ramuri (b), de la care metula (d) poartă sterigmele (d) care sînt aranjate verticilat și care au o formă de carafă.

Deși sporii ovoizi (g) cad din vîrfurile sterigmelor (d) și nu rămîn în lanțuri ci *în mod rapid fuzionează cu spori adiacenți pentru a forma ciorchini mari,* sau mingi *susținute de o substanță mucilaginoasă.* Această grupare a conidiilor în ciorchine sau în mase mari, îl deosebește de Penicillium.

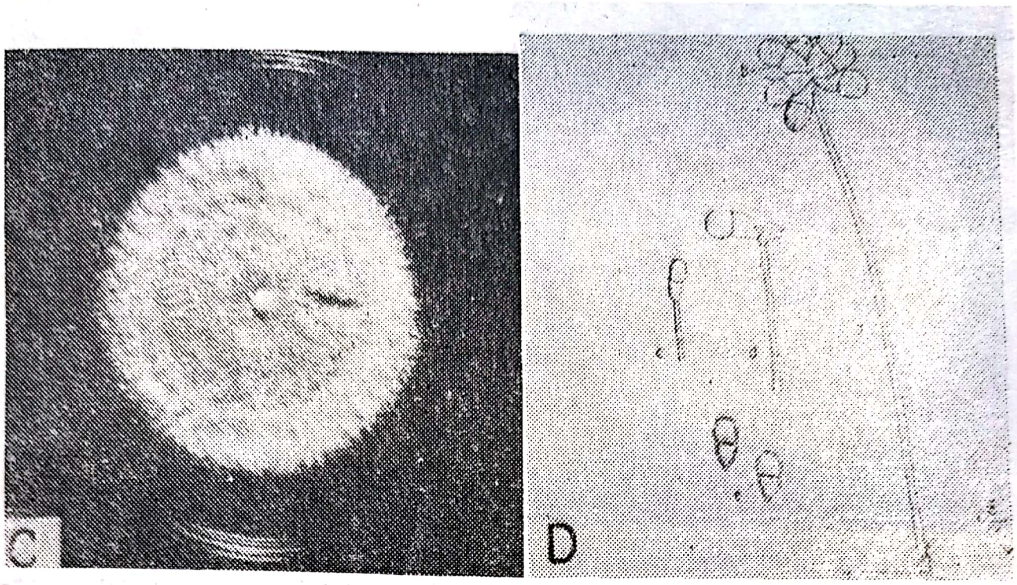



*Fig. 23* — Genul Trichothecium :

C — Fung rapid crescător (70 mm diametru în 9 zile) produce un miceliu alb lînos, aerian, care treptat devine de culoare ușor roză ; D — *Conidioforul lung, suplu, neramificat (a), poartă ciorchinii terminali de conidii piriforme* formate din 2 celule cu pereți netezi. Aceste conidii sînt produse ca umflături terminale ale conidioforelor (c), devin septate și înlocuite prin creșterea ulterioară a vîrfurilor conidioforelor (d) ; *continua formare de conidii la aplexul conidioforelor, conduce la formații în ciorchine.*

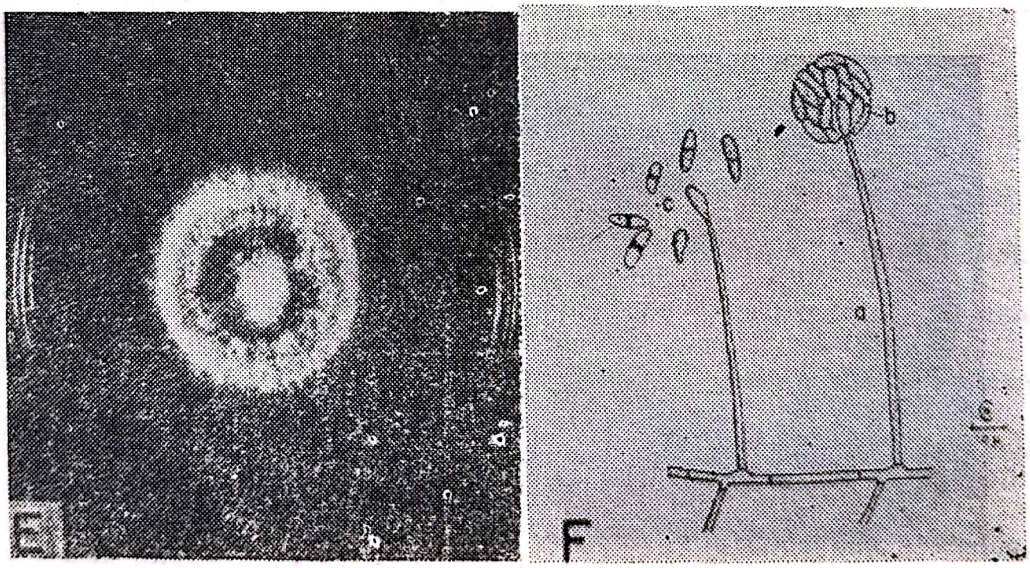



*Fig. 24* — Genul Cephalosporium :

E — Colonia cu creștere moderată (44 mm diametru în 7 zile) este la început compactă și roșu aprins ca culoare, dar devine acoperită de un miceliu alb lax ;

F — Conidioforele suple, neramificate (a) poartă un ciorchine (grup) sferic de conidiu în vîrf (b). Aceste conidii sînt în formă de elipsă și de obicei unicelulare, dar uneori, se văd septuri care împart conidia în 2 sau mai multe celule. Ele sînt produse numai din vîrful conidioforului (c) și par să fie susținute împreună de o substanță lipicioasă. Totuși ciorchinii cu spori sînt ușor disociați și culturile trebuie repicate pentru a obține un bun material microscopic (culturi subțiri sau examen pe cutia Pétri).



Scanned with OKEN Scanner

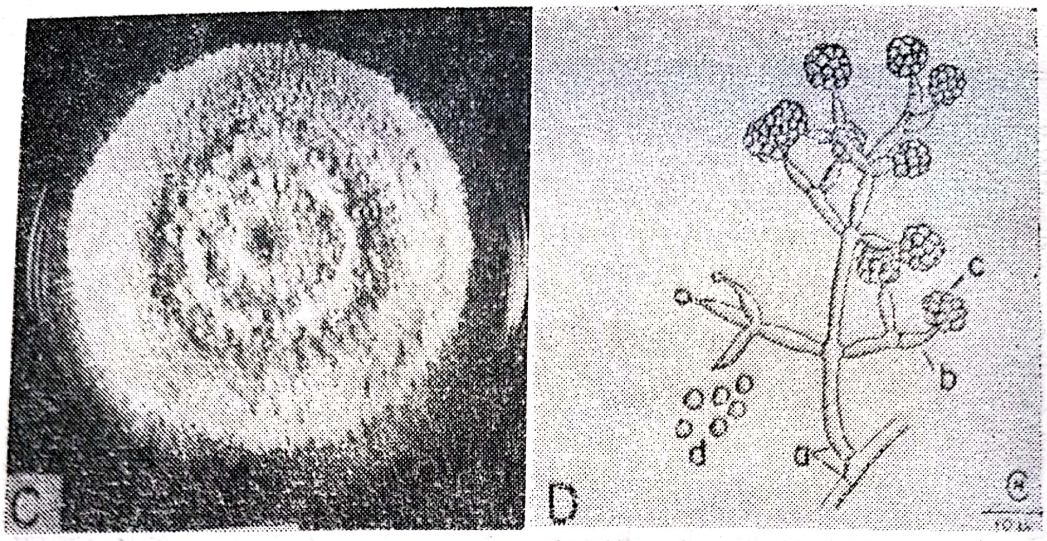



*Fig. 25* — Genul Trichoderma :

C — Colonie rapid crescătoare, umple placa Pétri în 5 zile, cu o formațiune întinsă pe suprafața agarului. Pe agar apar, smocuri compacte, lînoase de miceliu albe, formînd treptat ca o *rogojină densă* ce devine verde cînd sporulează (cînd se produc conidiile). Culturile în eprubete simulează macroscopic specii de Penicillium, dar creșterea prolifică și morfologia microscopică îl deosebește ;

D — Conidioforele (b) sînt ramuri scurte, neregulate ale miceliului (a) și nu sînt aranjate spiralat. Conidiile sînt sferice, compuse dintr-o singură celulă (d) și formează *ciorchini globulari* (c) la terminația conidioforilor, dar se disociază ușor. Ele nu pot fi complet văzute decît dacă preparatul microscopic este făcut cu mare grijă.

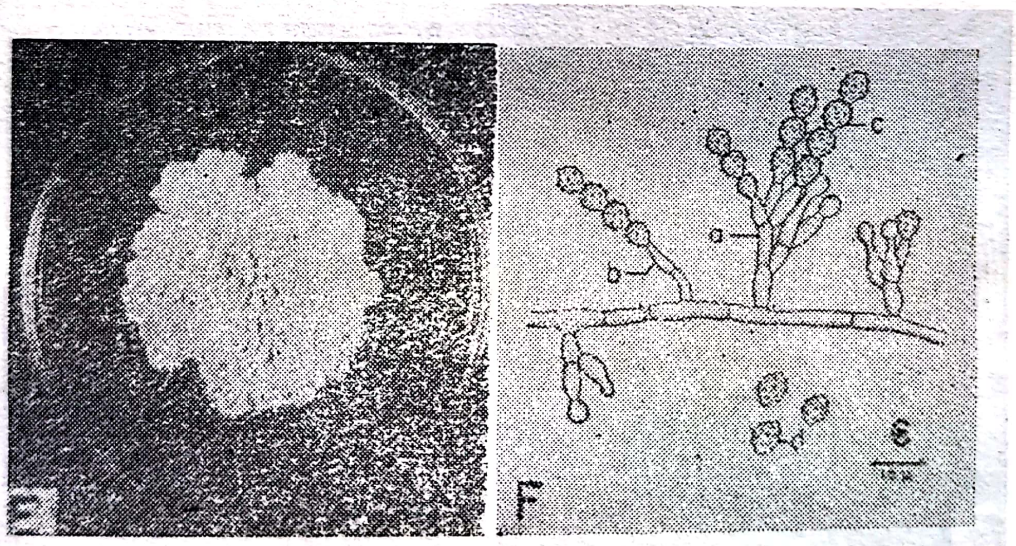



*Fig. 26* — Genul scopulariopsis* :

E — Colonie lent crescătoare (60 mm diametru în 18 zile) este la început membranoasă, zbîrcită, și glabră, pînă cînd se dezvoltă hifele aeriene și conidiile, moment cînd cultura are un aspect prăfos, maron deschis ;

F — Hifele purtătoare de conidii formează ciorchini (cluster) care seamănă la prima vedere cu Penicillium. Sterigmele purtînd lanțuri neramificate de conidii cu pereți rugoși (c), pot fi grupate in ciorchine (cluster) cu ramuri purtînd un conidiofer scurt (a) ; sau poate să aibă un aspect izolat de-a lungul hifei aeriene (b). Conidiile au formă caracteristică de lămîie (d).

---

[1] Deși speciile de scopulariopsis au fost găsite în micoze ale unghiilor și leziuni **granulomatoase profunde, ele sînt contaminate comun** și trebuie a fi investigate cu cea mai mare grijă înainte de a fi declarate agent etiologic al bolii.

# 5. Microbiologia produselor farmaceutice și cosmetice

## 5.1. MICROBIOLOGIA PRODUSELOR FARMACEUTICE

Contaminarea produselor farmaceutice cu germeni patogeni, condiționat patogeni sau chiar nepatogeni, ridică din ce în ce mai mult probleme de sănătate publică, colectivă sau individuală.

Medicamentele contaminate prezintă mare risc în cazul arsurilor, plăgilor și ulcerațiilor grave, mai ales cînd interesează mari suprafețe epidermice denudate.

Utilizarea aerosolilor ca vehicul pentru introducerea medicamentului în regiuni lipsite de germeni (exemplu, alveole pulmonare) impune o exigentă puritate microbiană.

Fabricarea medicamentului pe cale industrială favorizează contaminarea lui microbiană. Cu alte cuvinte, controlul microbiologic este și un indicator calitativ, oglindind acuratețea preparării medicamentului, începînd cu materia primă la produsul final.

Problema contaminării microbiologice a medicamentului devine și mai dificilă dacă ne referim la marea capacitate metabolică a germenilor de a se adapta la temperaturi diferite, pH-uri diferite și chiar stabilitatea de a utiliza anumite substanțe ca unică sursă de carbon sau azot prezente în medicament.

Activitatea enzimatică a bacteriilor psichrofile scade la temperaturi scăzute, însă crește durata lor de viață. Există bacterii care se înmulțesc și au un metabolism activ la temperaturi ridicate. Bacillus stearothermophillus se dezvoltă optim la 60—65°C, B. caldolyticus la 72°C, Acidothermus infernus la 88°C, Pyrodictium occultum la 105°C.

Capacitatea germenilor de a supraviețui și adapta la condiții de mediu diferite, uneori precare, explică marea lor plasticitate metabolică. Stafilococii, enterococii, se dezvoltă în soluții hipersaline (20—30%) devenind uneori medii de cultură, iar bacteriile zaharolitice se pot dezvolta chiar la concentrații mari de zaharuri (40—60%).

Tincturile alcoolice pot conține pînă la 50 000 germeni (Stavri) și chiar unii germeni sporulați (exemplu, Bacillus cereus) sînt citați ca agenți etiologici în infecții interioare de spital. Ciupercile se dezvoltă cu precădere în mediu acid, dar sînt altele, destul de multe, care se dezvoltă într-o gamă variată de pH, temperatură și umiditate, la concentrații diferite de substanțe sau alte modificări neprevăzute.



Scanned with OKEN Scanner

Industria cosmetică produce preparate utilizate atît de personalul medical, cît și de cadre medicale calificate (cosmeticieni), dar și de persoane individuale, mai mult sau mai puțin convinse de respectarea normelor minime de igienă.

Microorganismele interesate în infectarea medicamentului pot fi împărțite în două mari grupe : patogene și saprofite. Dar care este granița dintre ele ? Această graniță nu are o delimitare precisă, între ele se situează germenii condiționat patogeni, iar unii saprofiți pot deveni patogeni, cum și microorganismele patogene în anumite condiții de inadaptabilitate devin inactive. Microorganismele saprofite prezente frecvent în mediul înconjurător, reprezintă numărul și frecvența cea mai mare de germeni izolați din produsele farmaceutice, contribuind prin prezența lor la degradarea medicamentului.

Indubitabil, prezența microorganismelor patogene sau condiționat patogene exprimă existența unor condiții precare de igienă.

Gradul de poluare este mult mai redus pentru materiile prime realizate prin sinteză sau semisinteză, sau pentru substanțele izolate în stare pură. Purificarea cu solvenți organici pune la adăpost substanțele de contaminare microbiană. Substanțele cu un grad ridicat de puritate chimică prezintă număr redus de microorganisme.

Produsele de origine animală sau vegetală conțin număr ridicat de germeni, chiar milioane la gram sau mililitru.

Pudrele, suspensiile, soluțiile, au număr variabil de germeni, dependent de substanțele intrate în compoziție și vehiculate. Număr variabil de germeni conțin și agarul, gelatina, guma arabică, guma tragacanta, bentonita și caolinul. Pămînturile naturale trebuie cercetate cu atenție pentru germeni anaerobi, mai ales Clostridium tetani.

Apa distilată contaminată cu germeni influențează mult încărcătura bacteriană prezentă în produsele farmaceutice. Apa deionizată, apa filtrată prin membrane filtrante nesterile sau tratată cu ultraviolete, nu se recomandă pentru utilizare la prepararea medicamentului. În plus, apa chiar dacă a fost distilată în condiții optime, prin depozitare în vase nesterile și păstrare un timp mai îndelungat poate să se impurifice bacterian. Apa distilată are rol dublu în răspîndirea microorganismelor. În primul rînd, este o veritabilă sursă pentru vehicularea germenilor și un bun dizolvant în mediu, favorizînd dezvoltarea și răspîndirea microorganismelor.

Unele Enterobacteriaceae, Pseudomonas sp., dispun de un echipament enzimatic capabil să utilizeze ca unică sursă de carbon, agentul antimicrobian introdus în preparat. Astfel, Pseudomonas sp.., utilizează pentru creștere ca unică sursă de carbon, următoarele substanțe considerate cu acțiune bactericidă sau bacteriostatică : p-cresol, o-cresol, m-cresol, acidul benzoic, fenolul, acidul salicilic, acidul galic, hidrochinona etc.

Unii conservanți induc rezistența unor germeni. Boratul-fenilmercuric și polimixina B induc rezistența unor bacterii ca : Escherichia coli și Staphylococcus aureus, dar sînt inactive față de Pseudomonas aeruginosa. Mertiolatul este sigurul conservant care, pînă în prezent nu a indus rezistență față de germenii studiați (Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas, Staphylococcus aureus).



Scanned with OKEN Scanner

### 5.1.1. Principalii germeni izolați din produsele farmaceutice

Din produsele farmaceutice au fost izolate o varietate de specii bacteriene, aerobe, microaerofile, anaerobe, patogene, condiționat patogene sau nepatogene pentru om. Amintim cei mai importanți :

Bacillus spiralis : pilule preparate mecanic, colire
Clostridium perfringens : fiole cu adrenalină sau cu ser fiziologic.
Clostridium tetani : catgut, alcool medicinal, talc.
Candida albicans : unguente cu corticosteroizi, antibiotice.
Citrobacter : colire.
Enterobacteriaceae (în general) : produse chimice organice și minerale, produse de origine animală, vegetală, pudre, granule, comprimate, gelule, pomezi, supozitoare etc.
Escherichia coli : colire, amidon din cartof sau grîu.
Haemophilus conjunctivitidis : colire.
Haemophilus influenzae : colire.
Hafnia : colire.
Klebsiella : unguente cu corticosteroizi, antibiotice, aerosoli.
Micrococcus urae : colire.
Moraxella lacunata : colire.
Penicillium notatum : unguente cu corticosteroizi, antibiotice.
Pseudomonas sp. : apă sterilă, soluție clorhexidină, colire, unguente cu antibiotice, rezervorul de irigație al lichidelor, aparatura pentru distilarea apei.
Staphylococcus sp. : colire cu pilocarpină sau fluoresceină, pudră cu 1% clorhexidină, unguente cu corticosteroizi.
Sarcina letea : unguente cu corticosteroizi, antibiotice.
Serratia : colire.
Sacharomyces cerevisiae : unguente cu corticosteroizi, antibiotice.
Shigella : colire.
Salmonella : extract tiroidian, produse apoterapeutice.
Streptococcus faecalis : produse chimice organice și minerale, produse brute de origine animală și vegetală, pudre, granule, comprimate, gelule.

### 5.1.2. Originea contaminării produselor farmaceutice

Redăm, după Sikes, clasificarea căilor prin care se pot contamina produsele farmaceutice, clasificare pe care o considerăm cea mai completă :

— materia brută folosită la prepararea produsului : substanțe sintetice, semisintetice, substanțe de origine animală sau vegetală, substanțe adjuvante introduse în formulă, sursa de apă ;
— echipamentul și recipientele utilizate în timpul lucrului ;
— aerul și în general, mediul înconjurător ;
— operatorul ;
— recipientele (ambalajul) pentru produsul final ;
— modul de manipulare al medicamentului.



Scanned with OKEN Scanner

### 5.1.3. Norme pentru produsele farmaceutice

Pentru produsele farmaceutice obligatoriu „sterile" nu se admite nici un microorganism aerob, microaerofil sau anaerob, așa cum de fapt este stipulat în toate farmacopeele naționale și în farmacopeea internațională.

Produsele farmaceutice așa-zise „nesterile" sînt încă în discuție cu privire la normarea încărcăturii bacteriene, majoritatea recomandînd încărcătură cu germeni cît mai redusă (număr mic de germeni). De fapt, expresia „nesteril" a fost înlocuită cu „puritatea medicamentului".

Donny J. și Gerard P., consideră necesar ca produselor farmaceutice nesterile să li se aplice normele de calitate microbiologică propuse de Buttiaux și Morsel pentru produsele alimentare. Ei propun :

— absența germenilor patogeni dintr-un gram produs, mai ales enterobacteriaceae ;

— absența bacteriilor anaerobe toxigene, Clostridium botulinum și Clostridium perfringens în 5 grame produs.

— absența dintr-un gram produs a germenilor „indicatori ai poluării", germeni care aparțin florei intestinale.

— germeni saprofiți sub 100 000 în proba analizată după „îmbogățire accelerată".

Reuniunea grupului de lucru privind calitatea microbiologică a medicamentului ținută la Bruxelles în 26 mai 1971, a hotărît ca normele de „puritate microbiologică" trebuie să se adapteze particularităților produselor noi în raport cu materiile prime folosite în procesul de preparare. Exigențele trebuie să fie mai mari pentru preparate de uz local decît pentru preparatele de uz oral. Grupul de lucru propune următoarele norme :

— preparatele de uz local : sub 100 germeni la un gram produs analizat. Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae, lipsă.

— preparate de uz oral : sub 100 germeni, ciuperci și levuri la un gram produs analizat ; Enterobacteriaceae lipsă.

Comitetul laboratoarelor pentru controlul medicamentului din cadrul secției de farmacie FIP, analizînd în aprilie 1972 „puritatea microbiologică" a formelor farmaceutice nesterile, propune ca produsele farmaceutice să fie împărțite în patru categorii, normativul fiind dependent de aceste patru categorii (tabel nr. XXXIII).

*Tabel nr. XXXIII*

| *Preparatul* | *Exigențe* |
|---|---|
| I preparate injectabile | sterile |
| II. preparate oftalmice, preparate aplicate pe arsuri sau ulcerații | absența germenilor viabili într-un gram sau mililitru produs |
| III preparate medicamentoase pentru aplicații locale, nas, gît, urechi | 100 germeni la g sau ml. Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus lipsă |
| IV alte preparate | 1000 germeni la g sau ml. Germeni absenți la g sau ml. Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus<br>Ciuperci și levuri : 100 |



Scanned with OKEN Scanner

Farmacopeea USP ed. a XVIII-a specifică că preparatele nesterile nu trebuie să conțină germeni care pericliteză sănătatea omului. Se menționează supravegherea farmaceutică și igiena producției materiilor prime, cît și supravegherea stadiilor intermediare ale produsului din punct de vedere microbiologic. Ediția a XIX-a extinde inserarea procedeelor microbiologice, cît și metoda de lucru.

Farmacopeea nordică prevede pentru gelatină, amylum solani și apa purificată, următoarele norme :

| | | |
|---|---|---|
| gelatina | : | maximum 10 000 germeni la 1 g produs ; Escherichia coli aerogenes absent la 0,01 g produs ; |
| amylum solani | : | absent Escherichia coli la 10 g produs ; |
| apa purificată | : | maximum 50 germeni la 1 ml și Escherichia coli lipsă. |

Suedia prevede normele cele mai stricte pentru preparatele farmaceutice de uz local. Consiliul Național al Sănătății nu admite mai mult de 100 germeni la 1 g. Dacă această cifră este depășită, este necesar să se cerceteze Escherichia coli și Salmonella.

În Republica Socialistă România, normativele sînt elaborate de Ministerul Sănătății și incluse în literatura de specialitate.

## 5.1.4. Analiza microbiologică a produselor farmaceutice

Farmacopeele naționale obligă ca produsele farmaceutice administrate parenteral, sau cele utilizate la tratarea arsurilor, rănilor deschise sau cele care se aplică aseptic în secțiile de chirurgie, ginecologie, urologie, să fie lipsite de bacterii, ciuperci, levuri, virusuri, microorganisme capabile să se înmulțească în noua gazdă.

Componentele produsului final farmaceutic etichetat „steril" este necesar să fie chiar din faza inițială cît mai aproape de sterilitate, sau chiar lipsa totală a microorganismelor pentru a se evita apariția substanțelor pirogene de natură microbiană. Se cercetează prezența microorganismelor aerobe, microaerofile, anaerobe, ciupercilor, prin însămînțarea probelor în sau pe medii de cultură specifice care trebuie să rămînă sterile după o anumită perioadă de termostatare, la temperaturi caracteristice pentru fiecare grup de microorganisme.

### 5.1.4.1. Precontrolul mediilor de cultură

Precontrolul se începe cu mediile de cultură care vor fi folosite pentru controlul „sterilității". Se controlează sterilitatea mediilor de cultură (control NEGATIV), ca și capacitatea mediilor utilizate de a permite dezvoltarea optimă a microorganismelor test (control POZITIV). Se controlează un procent de 10% din mediile de cultură care vor intra în lucru. Farmacopeea română ediția a IX-a recomandă pentru testare trei medii de



Scanned with OKEN Scanner

cultură (1, 2, 3), repartizate cîte 15 ml în fiecare eprubetă. În mediile 1 și 3 se însămînțează 0,1 ml dintr-o suspensie spori de Clostridium sporogenes, cultură de 24 ore în diluție 1 : 200 000 ; separat, aceleași medii (1 și 3) se inoculează cu 0,1 ml cultură de 24 ore Staphylococcus aureus diluat 1 : 1 000, iar Candida albicans se însămînțează pe mediile 2 și 3 cu 0,1 ml cultură de 24 ore diluată 1 : 10 000. Aceeași manoperă se practică în paralel cu medii de cultură (1, 2, 3) care au fost testate în prealabil și care sînt considerate martori de creștere (martor POZITIV).

O altă tehnică utilizată și recomandată de o întreprindere mare producătoare de medii de cultură și produse farmaceutice (Merck) recomandă însămînțarea mediilor solicitate cu 0,1 ml dintr-o cultură de 24 ore cu o concentrație de 1 000 germeni la g sau ml. Pentru mediile aerobe se utilizează Staphylococcus aureus, pentru anaerobi Plectridium spheroides, iar pentru ciuperci Candida albicans.

În prezent, Institutul „Dr I. Cantacuzino" produce medii de cultură diverse și de bună calitate, testate de laboratorul propriu. Totuși, recomandăm ca, înainte de utilizare, mediile de cultură să fie testate din nou, indiferent de producător.

### 5.1.4.2. **Determinarea activității bacteriostatice și fungistatice**

Determinarea activității bacteriostatice și fungistatice se încadrează în precontrol.

Cercetarea se efectuează în paralel : un mediu de cultură în care s-a introdus o anumită cantitate din produsul de cercetat și același mediu lipsit de produsul cercetat. Testarea se efectuează față de Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, sau alți germeni, dependent de natura substanțelor bacteriostatice sau fungistatice prezente în produsul respectiv. Pentru orientare prezentăm tabelul nr. XXXIV.

*Tabel nr. XXXIV*

| *Inhibitori* | *Germeni aerobi — test* |
|---|---|
| control general | Staphylococcus aureus sau Escherichia coli |
| penicilină | Staphylococcus aureus |
| streptomicină | Escherichia coli sau Bacillus subtilis |
| compuși ai mercurului | Staphylococcus aureus sau Escherichia coli |
| sulfonamide | Escherichia coli |

Odată stabilită prezența activității bacteriostatice sau fungistatice, se trece la îndepărtarea acestora utilizînd una din metodele menționate mai jos :

— metoda diluției : se diluează produsul pînă la o diluție care asigură îndepărtarea efectului inhibant ;

— metoda inactivării directe prin adăugarea inactivantului potrivit (vezi tabelul XXXV) ;

— metoda aplicării membranei filtrante : se filtrează produsul de cercetat prin membrana filtrantă (pori 0,45 μm) urmat de spălări repetate (2—5 ori) cu bulion special pentru spălare.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru metoda inactivării directe se recomandă următorii inactivatori (tabel nr. XXXVI).

*Tabel nr. XXXV*

| *Inhibitori* | *Inactivatori* |
|---|---|
| peniciline | penicilinaze, hydroxylammoniumchlorid |
| streptomicină | cisteină, hydroxylammoniumchlorid (hydroxylaminhydrochlorid), penicilinaze |
| compuși ai mercurului sau alte metale grele | legături tip SH (tioglicolat, cisteină, glutation, dimercaptol |
| sulfonamide | acid-p-aminobenzoic |
| compuși cuaternari de amoniu | lecitină, Tween 80, Polyoxyäthylenäther, tioglicolat, cisteină |

Concentrația de tioglicolat în mediu trebuie să fie peste 0,5%.

Metoda spălării membranei filtrante se practică pentru orice produs care conține inhibitori, dar mai ales pentru produsele care conțin substanțe uleioase sau sînt nemiscibile cu apa. Produsele miscibile cu apa se diluează în ser fiziologic tamponat.

Se utilizează o membrană filtrantă cu diametrul porilor de 0,22 μm și o viteză de trecere 55—75 ml/minut la o presiune permisă de 70 mmHg. Aparatura se sterilizează prin autoclavare sau tratare cu oxid de etilen sau propilenoxid. Pentru a îmbunătăți filtrarea, înainte de filtrare se tratează produsul cu penicilinază sau celulază. Pentru a ușura filtrarea se poate utiliza un lichid de diluție albuminos, ca de exemplu, soluție extract de carne 1% (pH 7,1±0,2) (soluția A), sau la produsele care conțin lecitină sau ulei, pe lîngă soluția A se adaugă și 0,1% din soluția B (p-octylphenoxypolyäthoxyäthanol sau octylphenoldecaäthylenglycoläther) respectînd pH-ul recomandat mai sus. Exemplu, dacă produsul testat conține ulei, se trec prin membrana filtrantă 50 ml produs, după care se filtrează 200 ml din soluția B și final 100 ml din soluția A.

### 5.1.4.3. Număr de probe de prelevat

Farmacopeea română, ediția a IX-a recomandă :

*Tabel nr. XXXVI*

| *Totalitatea unităților din serie* | *Număr de probe ce se prelevează* | |
|---|---|---|
| | *sterilizate* | |
| | *autoclav* | *alte metode* |
| 1—1 000 | 5 | 10 |
| 1 000—10 000 | 10 | 20 |
| 10 000 | 20 | 40 |



Scanned with OKEN Scanner

Farmacopeea internațională recomandă :

*Tabel nr. XXXVII*

| *Unități per șarjă* | *probe* |
|---|---|
| pînă la 100 | 10 % cel puțin 4 unități |
| 100—500 | 10 unități |
| peste 500 | 20 unități (cel mult 2 %) |

*Cantitatea de produs* ce se însămînțează în mediile de cultură variază în funcție de volumul sau cantitatea din fiole sau flacon, starea fizică a produsului (lichidă sau solidă) și nu de neglijat normele recomandate de farmacopeele naționale.

Farmacopeea română, ediția a IX-a recomandă :

*Tabel nr. XXXVIII*

| *Pentru produse lichide* | | |
|---|---|---|
| *Volumul preparatului pe recipient* | *Cantitatea produs inoculat* | *Volumul mediului de cultură* |
| 1—10 ml | 1 ml | 15 ml |
| 10—15 ml | 5 ml | 40 ml |
| peste 50 ml | 10 ml | 40—100 ml |

*Tabel nr. XXXIX*

| *Pentru produse solide* | | |
|---|---|---|
| *Cantitatea pe recipient* | *Cantitate produs inoculat* | *Volumul mediului de cultură* |
| pînă la 50 mg | tot conținutul | 40 ml |
| 50—100 mg | 50 mg | 40—100 ml |
| 100—200 mg | jumătate din conținut | 40—100 ml |
| peste 200 mg | 100 mg | 100 ml |

Farmacopeea internațională recomandă :

*Tabel nr. XL*

| *Cantitatea probei* | *Contaminare bacteriană* | *Contaminare fungică* |
|---|---|---|
| *Lichide* | | |
| sub 1 ml | tot conținutul | tot conținutul |
| 1 ml—20 ml | 1/2 din conținut | 1/2 din conținut |
| 20 ml — sau mai mult | 10 % din conținut | 10 % din conținut |
| Solide Lichide | | |
| sub 50 mg | tot conținutul | tot conținutul |
| 50—200 mg | 1/2 din conținut | 1/2 din conținut |
| 200 mg sau mai mult | 100 mg | 100 mg |



Scanned with OKEN Scanner

Pentru a evita contaminarea în timpul recoltării, prelevarea probelor se va efectua aseptic, respectînd normele tehnice existente. Transportul probelor pînă la laborator se efectuează cît mai rapid și în condiții optime, pentru a se evita contaminarea și deteriorarea lor.

Dacă proba nu se poate introduce imediat în lucru, se va păstra la temperatura și în condițiile recomandate de producător, uneori temperaturile scăzute modifică calitatea produsului.

*Tehnica de lucru :* Produsele se însămînțează în condițiile recomandate de farmacopeea națională, direct în mediile de cultură, cu sau fără adaos de diluent sau emulgator (Tween 80), în funcție de starea fizico-chimică a produsului. Astfel, lichidele, soluțiile, suspensiile se trec direct în mediile de cultură, cele uleioase primesc 10% Tween 80 înainte de însămînțare, pulberile sau comprimatele se diluează direct cu apă sterilă sau ser fiziologic tamponat steril, mojarîndu-se în prealabil dacă este necesar. Cremele și unguentele încălzite la 40°C se amestecă în părți egale cu Tween 80 (aa 1—5 g sau ml) încălzit la 40°C, după care se completează cu soluție sterilă tampon fosfat pH 7 încălzită la 40°C pînă la obținerea proporției finale de 10%. Antibioticele se diluează cu apă sterilă sau ser fiziologic steril pînă la îndepărtarea efectului bacteriostatic, cu excepția penicilinelor care sînt tratate cu penicilinaze.

Din fiecare eșantion de pansament se taie în condiții de sterilitate 1 $cm^2$, apoi este introdus în 100 ml mediu de cultură, iar din materialele de sutură chirurgicale se iau cîte 12 fiole din fiecare serie pentru 100 ml mediu de cultură.

Pentru testarea sterilității se utilizează trei categorii de medii de cultură :

— mediul universal aerob-anaerob lichid cu tioglicolat (mediul nr. 1 I.C.), termostatat 7 zile la 30—35°C, după însămînțarea lui cu produsul farmaceutic ;

— mediul lichid Sabouraud glucoză-maltoză (ambele zaharuri sînt necesare pentru a favoriza dezvoltarea drojdiilor și ciupercilor) ; după însămînțare, termostatarea se efectuează 7 zile la 20—25°C ; produsele uleioase se termostatează 14 zile.

— bulion-glucozat, pentru dezvoltarea germenilor aerobi și favorizarea germinării sporilor. Acest mediu se însămînțează cu produsul farmaceutic în dublu exemplar și se termostatează 7 zile la 30—35°C și respectiv la 20—25°C, pentru a înregistra o gamă cît mai mare de germeni aerobi.

Pentru produsele farmaceutice insolubile, recomandăm înlocuirea mediului „aerob-anaerob fluid“ cu „bulion-tioglicolat“, ultimul permițînd vizualizarea creșterii bacteriene.

Mediile de cultură sînt pregătite și repartizate în eprubete și flacoane de mărimi diferite (10, 40 și 100 ml), pentru a permite însămînțarea lor cu cantități diferite de produs farmaceutic, conform schemelor înregistrate în text.

Pentru a controla sterilitatea mediilor folosite și acuratețea tehnicii microbiologice este obligatoriu să se termostateze concomitent cîte o eprubetă sau flacon cu mediu neînsămînțat.



Scanned with OKEN Scanner

| *Produsul farmaceutic* | | |
|---|---|---|
| Germeni anaerobi<br>mediu I.C. nr. 1<br>7 zile la 30—35°C | drojdii-ciuperci<br>Sabouraud-lichid<br>7 zile la 20—25°C<br>14 zile produse uleioase | germeni aerobi<br>bulion-geloză<br>7 zile la 30—35°C<br>7 zile la 20—25°C |

Testarea „sterilității" prin metoda „membranei filtrante" se practică în cazul simplificării metodei sau ca o probă în paralel, dar mai ales pentru produsele uleioase, alifii, produse care în mediile de cultură se solubilizează greu sau prin compoziția lor au activitate bacteriostatică sau bactericidă. Membrana filtrantă prin care s-a filtrat produsul se introduce în mediile lichide de cultură recomandate de farmacopeele naționale sau se depun pe medii solide. În cazul anaerobilor se utilizează medii speciale (recomandate în text), termostatate în condiții de anaerobioză (exemplu, incubare în prezența pirogalolului alcalin sau folosirea sistemului „Anaerocult A, P sau C").

### 5.1.4.4. Interpretarea rezultatelor este condiționată de recomandările farmocopeei naționale

Probele se consideră sterile, dacă toate eprubetele cu medii însămînțate păstrează transparența inițială pe toată perioada de incubare (F.R. ed. IX).

În cazul apariției unor modificări de transparență în perioada de observație, se însămînțează cel puțin cîte 1 ml în 2 eprubete cu mediu semisolid și alte 2 eprubete sau plăci Pétri cu mediu solid. Eprubetele și plăcile Pétri se termostatează la temperatura folosită anterior. După 3 zile de termostatare produsul este considerat steril dacă nu au crescut germeni pe unul din aceste medii de transfer (în acest caz transparența a fost modificată de alte procese fizico-chimice sau modificări de structură).

Dacă se constată creșteri de microorganisme în una sau mai multe eprubete însămînțate dintr-o serie, controlul sterilității se repetă pe un număr dublu de probe. Dacă la al doilea control, în una sau mai multe eprubete se constată creșterea unor microorganisme identice cu acelea din primul control, proba se consideră „nesterilă".

Dacă la al doilea control al sterilității se constată creșterea altor microorganisme comparativ cu primul control, se admite repetarea controalelor pe un număr identic de probe.

Dacă la al treilea control se constată din nou creșterea microbiană sau fungică chiar numai într-o singură eprubetă, proba se consideră „nesterilă".

Pentru materialele de natură chirurgicală, interpretarea rezultatelor controlului sterilității se efectuează în modul următor :

— în cazul cînd se constată creșterea de microorganisme la primul control în una sau mai multe eprubete, se procedează la identificarea microorganismului (vezi schema sumară de identificare). Dacă se constată prezența unor germeni anaerobi sporulați, seria se consideră „nesterilă" ;



Scanned with OKEN Scanner

— în cazul cînd microorganismele prezente sînt aerobe, saprofite, se procedează la un recontrol pe un număr dublu de eprubete. Dacă la recontrol seria nu corespunde cerinței de sterilitate, se admite un al treilea control pe același număr de eprubete ca și la al doilea control. Dacă și la al treilea control se constată creștere microbiană, chiar într-o singură eprubetă, seria este „nesterilă".

Nu se va elibera rezultatul final înainte de a avea siguranța deplină a sterilității produsului analizat.

Este necesar să reamintim obligativitatea controlării capacității de sterilizare a aparaturii cu care se efectuează sterilizarea materialului, cît și calitatea mediilor de cultură. Acest control se poate efectua prin intermediul „bioindicatorilor". Pentru documentare, citățm germenii test indicați în diferite procese de sterilizare :

| *Metoda de sterilizare* | *Germeni test* |
|---|---|
| temperatură uscată | Bacillus subtilis var. niger |
| vapori sub presiune (120°C) | Bacillus stearothermophilus |
| raze ionizante | Bacillus pumilis |
| etilenoxid | Bacillus subtilis var. niger |
| fierbere | Bacillus subtilis sau Clostridium sporogenes |

Atenție specială la tehnica însămînțării pentru anaerobi : produsul căruia i se face controlul sterilității pentru anaerobi se introduce încet cu pipeta Pasteur sau pipeta gradată. Se introduc 0,25—1,0 ml pentru eprubetele cu 15 ml mediu, maxim 2,0 ml pentru eprubetele cu 40 ml mediu.

### 5.1.5. Controlul purității microbiologice

Controlul purității microbiologice urmărește stabilirea numărului total de microorganisme aerobe și prezența germenilor patogeni în preparatele farmaceutice nesterile (F.R. ed. IX). Prin preparate farmaceutice nesterile, înțelegem materia primă, produsul în curs de fabricație și produsul farmaceutic final.

Riscul contaminării materiilor prime cu germeni patogeni, condiționat patogeni sau nepatogeni, poate fi împărțit în trei categorii :

— risc de gradul 1 : încărcătură mare de germeni : materia primă de origine animală contaminată primar sau secundar (exemplu, extract de ficat, tiroidă pulbere, făină de carne, praf de ouă, făină de oase, cazeină, peptone, gelatină, lapte praf, extract placentă etc.).

— risc de gradul 2 : încărcătură medie sau parțială cu germeni : materia primă vegetală de regulă contaminată secundar (guma arabică, guma tragacanta, făină de porumb, cacao pulbere, digitală pulbere, amidon de cartof, sau grîu, extract de drojdie, agar-agar etc.

— risc de gradul 3 : încărcătură bacteriană redusă : materia primă de origine sintetică sau minerală contaminată de obicei secundar.



Scanned with OKEN Scanner

Pe lîngă materiile prime menționate mai sus, nu trebuie neglijată apa deionizată, apa distilată, din care deseori s-au izolat germeni, în special Pseudomonas sp. și nu rareori Pseudomonas aeruginosa implicat mai ales în infecțiile interioare de spital.

Sînt supuse acestui control și elaborările din farmacii.

### 5.1.5.1. Prelevarea probelor

Proba trebuie să fie reprezentativă. Procentul de prelevări este același ca pentru cercetările chimice și fizice. Laboratoarele de specialitate, inclusiv laboratoarele de microbiologie din centrele sanitare antiepidemice, pot recolta probe din depozite, farmacii sau din unitățile sanitare ori de cîte ori există o suspiciune de produse contaminate sau suspicionate ca sursa unor infecții endemice sau epidemice. Aceste controale devin obligatorii și pentru întreprinderea producătoare care va utiliza în acest scop laboratorul propriu.

Tehnica de recoltare este aceeași ca pentru produsele sterile, adică instrumente sterilizate pentru recoltare, personal instruit, calificat, păstrarea probelor la temperatura recomandată de producător, laborator de diagnostic bacteriologic special pregătit în acest scop (boxe sterilizate, microaeroflora redusă etc.).

Cantitatea care se recoltează este stipulată de fiecare farmacopee națională. Pentru produsele finite Farmacopeea română ed. a IX-a recomandă : controlul se efectuează pe 5 g sau 5 ml preparat rezultat din omogenizarea a două ambalaje.

The United States Pharmacopeea, ediția a XVIII-a recomandă ca la fiecare șarjă să se recolteze 3 probe reprezentative de cîte 10 g sau 10 ml, rezultate prin amestecarea și omogenizarea mai multor porțiuni recoltate din diferite locuri, de obicei 10 subprobe a cîte 1 g fiecare. Proba 1 se utilizează pentru determinarea numărului total de unități formatoare de colonii (NTUFC), iar probele 2 și 3 pentru determinarea anumitor specii bacteriene (în special Salmonella, Staphylococcus aureus, Pseudomonas sp. și, dacă este cazul, unele specii anaerobe de interes medical).

### 5.1.5.2. Determinarea numărului total unități formatoare de colonii (NTUFC)

Determinarea numărului total unități formatoare de colonii se poate efectua prin trei metode :

a) metoda plăcii turnate (probe solubile, probe cu aspect clar) ;

b) metoda MPN (most probable number) pentru soluții neclare, opalescente, număr redus de germeni ;

c) metoda membranei filtrante (probe solubile, clare sau cu inhibitori bacteriologici).

Suspensiile și soluțiile apoase sau alcoolice-apoase (sub 30% alcool) se cercetează prin metoda plăcii turnate, mai ales suspensiile care prin starea lor fizico-chimică nu sînt potrivite filtrării prin membrane filtrante.



Scanned with OKEN Scanner

Substanțele finite, în mare parte, sînt solubile în apă, dar cele care sînt insolubile și au aspectul unor granule mai mari sau mai mici se macină în prealabil la un mixer (sau mojar) și eventual dacă este posibil se aduc în faza apoasă cu ajutorul unei soluții intermediare.

Substanțele insolubile sau lichide nemiscibile cu apa se emulsionează cu o cantitate minimă de emulgator steril (exemplu, Tween 80) încălzit la 40°C (nu se va depăși această temperatură) și dacă este necesar emulsionarea se va efectua prin intermediul unui omogenizator.

Gelatina se pregătește în anumite condiții : 10 g se introduc în bulion lactozat tamponat fosfatat și după 1—2 ore de depozitare la 8—10°C se introduce în baia de apă la 45°C pentru dizolvare (U.S.P. ed. a XVIII-a pretinde maximum 5 000 germeni la g).

a) *Metoda plăcii turnate*

Pentru fiecare diluție se folosesc 3 plăci Pétri. În fiecare placă se introduce cîte 1 ml din diluția respectivă. Plăcile 1 și 2 se amestecă cu geloză nutritivă (circa 15 ml) răcită la 45°C, din care una se termostatează la 20—25°C, iar alta la 30—35°C timp de 48 ore. Se poate utiliza și temperatura de 37°C, părerile cercetătorilor fiind diferite. Placa nr. 3 se amestecă cu mediul Sabouraud gelozat și răcit la 45°C, iar după omogenizare și solidificare se depune la 20—25°C pentru 7 zile. Omogenizarea amestecului este de mare importanță (în sensul cifrei 8) pentru a se asigura răspîndirea coloniilor uniform pe toată suprafața plăcii.

Interpretare : se iau în considerare plăcile Pétri cu număr de colonii contabilizabile, de preferat numărul de colonii între 30—300. După calcularea numărului de colonii pentru fiecare diluție în parte se calculează NTUFC raportat la g sau ml.

Totuși, este bine să notificăm următoarele situații care se pot ivi :

— nu se iau în considerare diluțiile unde numărul coloniilor este sub 10% din cifra realizabilă la diluția anterioară (omogenizarea incorectă) ;

— plăci Pétri numai sub 30 colonii : se numără coloniile și se raportează numărul lor la diluția respectivă. Exemplu, colonii la diluția $10^{-1}$ ;

— placă Pétri peste 300 colonii : se alege o porțiune mai reprezentativă, se numără pe o suprafață de 1 $cm^2$, se calculează numărul total la suprafața plăcii Pétri și la diluția respectivă după care se raportează NTUFC la g sau ml, calculînd media tuturor diluțiilor. Totuși, pentru un rezultat de mai mare precizie, recomandăm repetarea analizei dacă este posibil ;

— colonii în pînză : acestea se pot prezenta sub trei aspecte. Primul aspect este reprezentat de colonii în lanț, neseparate, aspect probabil din cauza dezintegrării grupului bacterian. Al doilea aspect este reprezentat de colonii care se dezvoltă între peretele interior al plăcii Petri și stratul de geloză, iar aspectul 3 apare sub formă de film la suprafața gelozei sau la margini. În aceste cazuri, fiecare film sau lanț bacterian se consideră o singură colonie. Tipul 2 nu se ia în considerare, analiza se va repeta dacă este posibil.

b) *Metoda diluțiilor în tuburi* (MPN) se practică de obicei în cazul numărului redus de germeni sau cînd materialul de cercetat are un aspect fizic care nu permite citirea coloniilor în placa Pétri turnată.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru fiecare probă se utilizează 12 eprubete cu mediu (bulion nutritiv). Nouă eprubete se însămînțează cu materialul de cercetat (cîte 3 eprubete pentru fiecare diluție), iar ultimele 3 eprubete nu se însămînțează fiind considerat martor de sterilitate.

c) *Metoda membranei filtrante pentru unități formatoare de colonii.*

Această tehnică se practică în prezența unor produse farmaceutice care conțin substanțe bacteriostatice sau fungistatice sau în cazul unui număr redus de germeni sau ca metodă de elecție pentru unele laboratoare.

Farmacopeea română recomandă următoarea tehnică de lucru pentru produsele farmaceutice : soluția se împarte în trei părți egale și se filtrează printr-o membrană cu porozitatea 45 μm. După filtrare, filtrele se spală cu apă distilată sterilă, apoi cu apă peptonată sterilă.

Două din membranele filtrante se așază pe suprafața mediului geloză nutritivă turnat în plăci Pétri. Una din plăci se termostatează la 35—37°C, iar cealaltă la 24°C, timp de 24 ore. A treia membrană filtrantă se așază pe suprafața mediului Sabouraud turnat în plăci Pétri ; se termostatează la 20—25°C.

Citirea rezultatelor se efectuează după 2 zile pentru germeni și levuri și după 3—5 zile pentru fungi.

### 5.1.5.3. Determinarea numărului probabil de coliformi totali și Escherichia coli

a) *Test prezumtiv pentru coliformi totali*

— se efectuează diluții zecimale (respectă un bun amestec) pînă la $10^{-4}$ sau mai mult dacă este necesar ;

— din fiecare diluție se repartizează în cîte trei eprubete cu lauryl-sulfat-triptoză (LST) cîte 1 ml pentru fiecare eprubetă din fiecare diluție ;

— lichidul rezidual din pipetă nu se suflă, ci se folosește pentru fiecare diluție altă pipetă sterilă ;

— se termostatează la 35—37°C timp de 48 ore±2 ore ;

— după 24 ore se citește formarea de gaze în tubul Durham sau apariția unei efervescențe, dacă eprubeta este ușor agitată ; se termostatează din nou ; dacă toate eprubetele prezintă gaze nu se mai termostatează ;

— după 48 ore se notează numărul eprubetelor care prezintă gaze sau efervescență, considerînd ca test prezumtiv pozitiv pentru coliformi totali.

b) *Test de confirmare pentru coliformi totali*

— înainte de însămînțare se agită ușor eprubeta cu lauryl-sulfat-triptoză citită anterior sau se amestecă conținutul prin ușoară înclinare sau rotire ;

— cu ansa se recoltează din eprubetele pozitive și se trece în BBLV (bulion-bilă-lactoză-verde briliant) ;

— termostatare la 35—37°C timp de 48 ore±2 ore ;



Scanned with OKEN Scanner

— se determină numărul probabil de coliformi pe baza numărului eprubetelor BBLV care au prezentat gaze după 48 ore de termostatare (se consultă tabelul MacCrady) ;

— se raportează numărul probabil de coliformi totali la gram sau mililitru.

c) *Test de confirmare pentru Escherichia coli*

— înainte de însămînțare se agită ușor fiecare eprubetă cu lauryl-sulfat-triptoză sau se amestecă prin ușoară înclinare și rotire ;

— se transferă o ansă din fiecare LST pozitiv, în bulion McConkey ;

— termostatarea la 45,5°C+0,05°C la baia de apă care se menține acoperită, iar nivelul apei să fie permanent peste nivelul mediilor de cultură din eprubete ;

— eprubetele cu mediul McConkey pozitive (bule de gaze în tubul Durham) se însămînțează pe mediul Lévin în așa fel încît să se obțină colonii izolate ;

— se termostatează la 35—37°C timp de 18—24 ore ;

— se examinează plăcile cu mediul Lévin (eozină metilen bleu = EMB) pentru colonii tipice (colonii cu centrul negru-albastru, cu sau fără luciu metalic) ;

— dacă au crescut colonii tipice se repică 2 colonii și se trece pe geloză înclinată ;

— dacă nu au crescut colonii tipice se repică cel puțin 2 colonii pe geloză înclinată ;

— termostatarea se execută la 35—37°C timp de 18—24 ore ;

— se efectuează un frotiu Gram și testul IMVIC (indol, metil-roșu, Voges-Proskauer, citrat Koser) ;

— se încadrează ca Escherichia coli după tabelul nr. XLI. :

*Tabel nr. XLI*

| *Indol* | *RM* | *VP* | *Citrat* | *Tipul* |
|---|---|---|---|---|
| + | + | − | − | Esch. coli tipic |
| − | + | − | − | Esch. coli atipic |
| + | + | − | + | Tipic intermediar |
| − | + | − | + | Atipic intermediar |
| − | − | + | + | Tipic A. aerogenes |
| + | − | + | + | Atipic A. aerogenes |

Se consideră ca Escherichia coli primele două variante din tabel ; se raportează pe baza tabelului numărul probabil de Escherichia coli la g sau ml.

d) *Test rapid orientativ pentru Escherichia coli*

Tot prin tehnica diluțiilor se însămînțează cîte 3 eprubete pentru fiecare diluție, cu cîte 1 ml în mediul McConkey.

— se termostatează în baia de apă la 44,5°C±0,05°C timp de 24 ore ;

— se trece pe EMB cu ansa ;

— se termostatează la 35—37°C timp de 18—24 ore ;



Scanned with OKEN Scanner

— se notează diluțiile și numărul eprubetelor care au prezentat colonii tipice prin trecere pe EMB ; se calculează numărul probabil de coliformi totali și se raportează la g sau ml.

### 5.1.5.4. Determinarea germenului Staphylococcus aureus

Izolarea germenului se efectuează însămînțînd 5 g (ml) sau 10 g (ml) în bulion nutritiv, de preferat bulion-peptonă din soia și cazeină.

— se termostatează la 35—37°C pînă la apariția unei opalescențe, maximum 2 zile ;

— se trece cu ansa pe mediul Chapman solid, geloză-sînge sau Vogel-Johnson ;

— termostatare la 35—37°C timp de 18—24 ore, la nevoie se prelungește pînă la maximum 48 ore ;

— coloniile suspecte se examinează Gram ;

— cocii Gram pozitivi cu aspect morfologic specific se testează pentru coagulază.

### 5.1.5.5. Determinarea germenilor Pseudomonas aeruginosa

O ansă din mediul nutritiv însămînțat pentru stafilococi se trece pe Cetrimid-agar (de preferat), Istrati-Meitert sau alt mediu de cultură recomandat de literatura de specialitate :

— se termostatează la 35—37°C timp de 24 ore ;

— se testează pentru oxidază și colorația Gram ;

— bacilii Gram negativi, oxidază pozitivi, se trec pe Pseudomonas-Agar P (formare de piocianină sau piorubină) sau și pe Pseudomonas-Agar F (formare de fluoresceină) ;

— se termostatează la 35—37°C timp de 24 ore ;

— se observă formarea pigmenților și se efectuează studii morfologice și culturale biochimice (recomandate la capitolul „produse cosmetice"), dacă este necesar.

### 5.1.5.6. Determinarea enterobacteriaceaelor (cu referire în special la Salmonella, Escherichia coli, Shigella)

În funcție de cantitatea probei de cercetat se însămînțează 1—5—10 g (ml) în bulion lactozat, respectînd proporția probă : mediu de cultură 1 : 10. Dacă se cercetează materia primă sau intermediară și este în cantitate suficientă pentru cercetare, este de recomandat să se însămînțeze 25 g (ml) sau 50 g (ml), respectînd și în acest caz proporția 1 : 10 față de mediul de cultură.

— se termostatează la 35—37°C timp de 6 ore pînă la 48 ore ; numărul de ore necesar pentru incubare depinde de încărcătura de ger-

meni ; nu se va depăși 48 ore. În momentul cînd a apărut creștere evidentă se efectuează treceri pe mediile de cultură specifice, după cum urmează :

— se însămînțează 1 ml în 10 ml bulion-selenit-cistină și/sau bulion-tetratinoat (medii de îmbogățire pentru Salmonella), mediul GN (mediu de îmbogățire pentru Gram negativi cu referire la Enterobacteriaceae), iar cu ansa se însămînțează pe Lévine (Esch. coli) și ADCL (în special pentru Shigella, Salmonella, Yersinia enterocolitica) ;

— se termostatează 18—24 ore la 35—37°C ;

— din mediile de îmbogățire se efectuează treceri cu ansa pe ADCL, Wilson-Blair sau alt mediu de cultură cu rezultate similare sau mai bune ;

— mediul ADCL se termostatează 18—24 ore la 35—37°C. În cazul unei slabe dezvoltări se prelungește incubarea încă 24 ore, iar mediul Wilson-Blair se termostatează 48 ore la 35—37°C ;

— coloniile lactoză-negative sau cu creștere specifică pe mediile de cultură menționate în text se repică pe AABTL-AGAR (albastru-brom-timol-lactoză) și direct pe TSI, după care urmează tentativa de încadrare taxonomic după proprietățile biochimice specifice menționate în literatura de specialitate.

După terminarea speciei se trece la diagnosticul serologic cu seruri specifice pentru Salmonella, Shigella și Escherichia coli enteropatogen, sau și alte seruri dacă este cazul.

Dacă au crescut și alte enterobacteriaceae se menționează în buletinul de analiză.

În concluzie, determinarea „purității microbiologice" este utilă pentru a evita apariția unor infecții accidentale suplimentare care pot periclita starea de sănătate a bolnavului tratat.

## 5.2. MICROBIOLOGIA PRODUSELOR COSMETICE

Se cunoaște de mult capacitatea microorganismelor de a se înmulți în produsele cosmetice, în condiții variate de mediu.

Unele microorganisme produc degradarea și prin aceasta creșterea toxicității produsului cosmetic pentru organismul uman.

Progresele recente în chimie și tehnologie au dus la descoperirea și introducerea unor noi substanțe, utilizate larg în industria farmaceutică și cosmetică. Aceste substanțe sînt utilizate ca solvenți, agenți activi de suprafață, vehiculi sau baze pentru prepararea produsului cosmetic. Prin aceasta, în anumite condiții, poate să crească capacitatea dezvoltării germenilor și diversitatea lor.

Majoritatea cosmeticelor intră în contact cu pielea sau mucoasele, favorizînd posibilitatea pătrunderii și unor germeni patogeni, condiționat patogeni sau nepatogeni. Apare, deci, o patologie specifică de natură microbiană, patologie care poate fi corelată cu sensibilitatea alergică a unor persoane față de unele componente ale produsului.

Din aceste motive, este necesar ca produsele cosmetice să fie supuse controlului microbiologic de laboratorul întreprinderii producătoare (con-

trol și calitate), de laboratoarele de sănătate publică sau de alte laboratoare specializate în cercetarea produselor farmaceutice și cosmetice (control sanitar).

Unele tehnici microbiologice sînt similare tehnicilor inserate la capitolul „puritatea medicamentului", însă am crezut necesar să sintetizăm o metodologie unică, orientativă, care poate fi practicată în orice laborator de specialitate, reprezentînd un ghid util cercetătorului.

### 5.2.1. Recoltarea și pregătirea probelor

Numărul de probe recoltate trebuie să fie statistic reprezentativ :

— cantitatea necesară pentru analiza microbiologică : 10 g/ml ; dacă produsul analizat este sub 10 g/ml se recoltează toată cantitatea ;

— produsul se analizează imediat ce a intrat în laborator ; dacă cercetarea microbiologică nu se poate efectua imediat, produsul se depozitează la temperatura camerei (15—20°C), sau la temperatura indicată de producător ; se evită termostatarea, refrigerarea sau înghețarea produsului înainte sau după analiză ;

— proba se inspectează macroscopic, notîndu-se în caietul de lucru unele observații constatate : culoarea produsului modificată sau nemodificată, consistența, continuitate sau contiguitate la scurgere, miros specific sau nespecific (alterare), aspectul și integritatea ambalajului ;

— înainte de deschidere, ambalajul este supus dezinfecției exterioare cu o mixtură apoasă alcool etilic 80% (V/V) și 1% HCl (V/V) ; după dezinfecție se usucă suprafața dezinfectată, prin ștergere cu un tampon steril ;

— dacă din aceeași probă se cer multiple analize (microbiologice, toxicologice, chimice etc.), examenul microbiologic are prioritate. În acest caz, cantitatea utilă diagnosticului microbiologic este dependentă de celelalte examinări, însă pe buletinul de analiză se va menționa cantitatea care s-a folosit pentru examenul microbiologic. Exemplu, dacă proba conține 5 g/ml, cel puțin 1/5 din probă (1—2 g/ml) se utilizează pentru examenul microbiologic.

### 5.2.2. Pregătirea produsului cosmetic în funcție de consistență și starea fizică

Lichide : 10 ml se adaugă la 90 ml diluent ; dacă analizăm o cantitate inferioară se respectă raportul probă/diluent 1/10. Exemplu, 5 ml produs + 45 ml diluent.

— consistență solidă, pulberi : se cîntăresc aseptic 10 g în mojar steril, iar în timpul mojarării adăugăm picătură cu picătură 10 ml Tween 20 sau Tween 80 steril, pînă obținem o bună omogenizare sub formă de pastă, după care se completează cu diluent pînă la diluția 1/10. O bună omogenizare a produsului este de mare importanță ;

— produse uleioase (creme și uleiuri) : într-un mojar steril se adaugă 10 g/ml produs ; se mojarează cu insistență adăugînd picătură cu picătură



Scanned with OKEN Scanner

1,0 ml ulei de parafină steril, urmat de 1,0 ml Tween 20 sau Tween 80 steril, continuînd cu 4—5 ml diluent în porțiuni de 1 ml pînă obținem o bună omogenizare ; pentru finalizarea diluției 1/10 se completează lent cu diluent ;

— aerosoli sub formă de pulberi, săpunuri, lichide și alte produse similare : după dezinfectarea ambalajului se exprimă 10 g/ml din produs într-un flacon steril, sub controlul balanței ; se amestecă bine. Dacă această manoperă nu este posibilă, cum este cazul deodoranților, se sifonează timp de 30 secunde în flacon steril și se amestecă bine în prezența a 90 ml diluent ;

— indiferent de produs, se efectuează diluții zecimale pînă la $10^{-4}$ ; diluția de pornire : 10 g/ml la 90 ml diluent.

### 5.2.3. Analiza microbiologică propriu-zisă

Cercetarea microbiologică ia în considerare următoarele aspecte :

a) Încărcătura microbiană, inclusiv drojdii și mucegaiuri reprezentată în final prin „număr total de unități formatoare de colonii" (NTUFC).

b) Cercetarea spectrului microbiologic al produsului cosmetic.

c) Prezența unor germeni de interes medical.

#### 5.2.3.1. Număr total unități formatoare de colonii (NTUFC) (germeni)

Medii de cultură : geloză simplă nutritivă, pe bază de peptonă triptică ;

— diluțiile bine omogenizate se repartizează în duplicat în plăci Pétri, pipetînd cîte 1 ml în fiecare placă ;

— în fiecare placă Pétri se toarnă 12—15 ml geloză simplă răcită la 45—47°C (nu se depășește această temperatură), omogenizînd bine amestecul prin mișcarea plăcii Pétri în sensul cifrei 8 ;

— se termostatează plăcile Pétri (întoarse) la 35—37°C ; citirea se efectuează după 24—48 ore ;

— se iau în considerare plăcile Pétri cu germeni între 30—300 colonii ; NTUFC se finalizează calculînd toate diluțiile sau cel puțin trei diluții succesive, împărțind la numărul de diluții calculate și în final raportînd NTUFC la g sau ml ; în cazul imposibilității contabilizării datelor se menționează în buletin NUFC existent la diluția respectivă.

#### 5.2.3.2. Număr total unități formatoare colonii (NTUFC) (drojdii și mucegaiuri)

Medii de cultură : Sabouraud ;

— se însămînțează cîte 1 ml din fiecare diluție în patru plăci Pétri pentru fiecare diluție ;

— în fiecare placă Pétri se toarnă cîte 20 ml mediu Sabouraud ;



Scanned with OKEN Scanner

— se amestecă bine respectînd traiectul cifrei 8 ;

— după solidificarea mediului se întorc plăcile și se termostatează cîte un duplicat din fiecare diluție la 35—37°C și altul la 28°C, timp de 7 zile, controlînd zilnic plăcile ;

— se calculează numărul unități formatoare colonii (NTUFC) (vezi punctul 5.2.3.1) ;

— pentru identificare și taxonomie recomandăm consultarea literaturii de specialitate sau consultarea unui laborator specializat în micologie.

### 5.2.3.3. Cercetarea spectrului microbiologic al produsului cosmetic

În produsele cosmetice pot fi prezenți diferiți germeni, patogeni sau nepatogeni, bacili sau coci, germeni sporulați sau nesporulați, Gram negativi sau Gram pozitivi, aerobi, microaerofili sau anaerobi.

Pentru evidențierea acestora este util să se folosească mai multe sortimente de medii de cultură, începînd cu medii simple (bulion nutritiv, geloză nutritivă), medii nutritive pe bază de peptone triptice bogate în acizi aminați și medii îmbogățite prin adaos de produse biologice (sînge, ser, factori hemoglobinici etc.), medii speciale pentru anaerobi, universale sau specifice pentru un anumit grup.

5.2.3.3.1. *Tehnica de lucru pentru germeni aerobi :* se inoculează cîte 1 ml din diluția primară a produsului cosmetic în mediul BCT-80, sau în lipsa acestuia se poate utiliza mediul universal nr. 1 I.C. ;

— termostatarea 7 zile la 35—37°C, urmărind zilnic apariția unei turbidități ; dacă apare o tulburare evidentă a mediului se însămînțează cu ansa cîte o placă cu geloză simplă nutritivă, geloză sînge (sau Brucella-agar) în mediul McConkey ;

— coloniile crescute pe unele din aceste medii de cultură se cercetează după tehnicile curente.

5.2.3.3.2. *Tehnica de lucru pentru germeni anaerobi :* inițial, din diluția primară se însămînțează 1 ml și în mediul universal nr. 1 I.C. repartizat în eprubete cel puțin 15 ml peste care se depune un strat ulei de parafină steril ;

— termostatarea 7 zile la 35—37°C ;

— dacă apare creștere evidentă, constatată prin bacterioscopie, se însămînțează cu ansa sau cu pipeta Pasteur din mediul nr. 1 I.C. o placă cu geloză sînge, una cu mediul Nagler și alta cu mediul Willis-Hobbs. Plăcile se termostatează în condiții de anaerobioză pentru a favoriza dezvoltarea germenilor anaerobi și pentru a pune în evidență unele caractere enzimatice importante pentru diagnostic : lecitinaza (Clostridium perfringens, Cl. oedematiens, Cl. bifermentans, Cl. septicum), proteolitice (Cl. sporingenes, Cl. bifermentans, Cl. histolyticum).

Înainte de a îndepărta falconul cu BCT-80 se efectuează un frotiu Gram în cazul apariției unei opalescențe suspecte.

5.2.3.3.3. *Considerații generale privind orientarea în diagnostic :* după termostatare, se trece la examinarea coloniilor care au crescut, atît pe mediile aerobe cît și anaerobe, notîndu-se aspectul lor morfologic, comportamentul enzimatic și alte caractere constatate ;



Scanned with OKEN Scanner

— se efectuează un frotiu Gram din coloniile izolate, se notează Gram pozitiv sau Gram negativ și se repică pe mediul potrivit pentru a obține colonii pure, de preferat un mediu care să nu altereze calitățile morfologice și biochimice ale germenului ;

— coloratia Gram se poate efectua după metoda Gram clasică sau modificată după Hucker. Indiferent de metoda folosită, recomandăm ca recolorarea cu alcool-acetonă să se efectueze timp de un minut, pentru a evita o eroare de diagnostic. Unele laboratoare utilizează sistemul „Bactident-Aminopeptidase", test care diferențiază net germenii Gram negativi de germenii Gram pozitivi ;

— pentru a evita interferarea testelor biochimice, testele se efectuează pornind de la o cultură pură crescută într-un mediu lichid relativ simplu, dar nutritiv (exemplu, apa peptonată concentrată). Acest procedeu este util și pentru examinare în contrast de fază. Testele biochimice trebuie alese cu mult bun simț, dependent de o bună pregătire profesională. Exemplu, Pseudomonas aeruginosa poate fi ușor recunoscut după aspectul lui de bacil Gram negativ, flagelare polară, producere de pigment fluorescent (mai ales pe medii de cultură speciale), descompune glucoza oxidativ și este indofenoloxidază pozitiv.

În general, testele cele mai utilizate și recomandate sînt : oxidaza, catalaza, indologenaza, reacția față de R.M. și V.P., reducerea nitraților, producerea de hidrogen sulfurat (mediul TSI în cazul enterobacteriaceelor, benzi pentru alți germeni), descompunerea zaharurilor sau alcoolurilor cu gaz sau fără gaz, metabolizarea unor acizi aminați (liozina, ornitina, arginina). Nu trebuie neglijate temperatura specifică și optimă de creștere, rezistență și dezvoltare la anumite concentrații de clorură de sodiu, gradul de mobilitate și eventual sensibilitatea față de unele antibiotice.

Pentru încadrarea germenilor în gen sau specie se utilizează rațional unele din testele menționate, ținînd seama de aspectul morfologic al bacteriei, comportamentul față de coloratia Gram și comportarea lor specifică pe unele medii de cultură.

5.2.3.3.4. *Cercetarea unor germeni de interes medical.* a) *Salmonella* fiind mult implicată în patologie și avînd în vedere marea ei circulație în mediul extern, considerăm necesar să prezentăm schema redusă pentru diagnostic.

Colonia lactoză negativă pe mediul McConkey sau alt mediu similar se repică pe TSI și pe AABTL, după care este supusă următoarelor teste :

— creșterea specifică pe TSI (descompune glucoza cu gaz sau fără gaz, nu descompune lactoza și zaharoza, în general produce hidrogen sulfurat) ;
— aglutinare cu ser polivalent H ;
— aglutinare cu ser polivalent O ;
— aglutinare cu ser polivalent specific de grup 0 ;
— fermentarea dulcitolului ;
— decarboxilarea lizinei ;
— urează negativ.

Pentru un diagnostic „prezumtiv" se poate practica aglutinarea „screening" cu ser polivalent H a unei colonii lactoză negativă. Coloniile lactoză negative se repică în bulion nutritiv (de preferat bulion-creier-cord) și se termostatează 4—5 ore la 37°C pînă apare tulburarea evidentă



Scanned with OKEN Scanner

a mediului. Din această cultură efectuăm treceri pe TSI (pentru testare biochimică minimă) și 1 ml din cultura tînără se tratează cu 1 ml ser fiziologic formolat 0,6%. Din cultura formolată se repartizează într-o eprubetă (diam. 10/100 mm) 0,5 ml peste care se adaugă 0,5 ml ser polivalent H adus la titrul de lucru după indicațiile producătorului. După o oră de termonstatare la 37°C se poate citi cu ochiul liber flocularea în caz de reacție pozitivă (prezența antigenelor H). Pentru confirmare definitivă, se ține seama de schema minimă inserată în text.

b) *Staphylococcus aureus* (prezență și număr total la g sau ml) :

— medii de cultură : Vogel-Johnson sau Chapman ;

— din diluțiile 1/10 și 1/100 efectuate pentru NTUFC se repartizează cîte 0,5 ml în fiecare placă Pétri cu mediu Vogel-Johnson sau Chapman ;

— inoculul se răspîndește uniform pe toată suprafața mediului cu ajutorul baghetei de sticlă în formă de L ;

— termostatare la 35—37°C ;

— după 48 ore de termostatare se citesc plăcile, observîndu-se coloniile caracteristice (negre cu luciu metalic cu sau fără zonă galbenă pe mediul Vogel-Johnson, colonii galbene cu zonă galbenă pe mediul Chapman) ;

— se repică pe geloză nutritivă 10 colonii caracteristice ;

— termostatare 24 ore la 35—37°C ;

— cocii Gram pozitivi, cu aspect specific la examenul microscopic se testează pentru coagulază ;

— calculul general : notăm cîte colonii din 10 au fost C.P. și recalculăm la numărul total de colonii cu aspect caracteristic pe placa Pétri.

c) *Pseudomonas sp.*, frecvent întîlnit în produsele farmaceutice și cosmetice.

Caracteristici de gen : germeni Gram negativi, asporogeni, catalază pozitivi, de obicei oxidază pozitivi, scindează glucoza pe cale oxidativă cu excepția Pseudomonas alcaligenes, pseudoalcaligenes, diminuta, vesicularis (+32%), acidovarans și testosteroni.

Pentru încadrare în gen și specie, se efectuează următoarele teste, în totalitate sau numai parțial dependent de specie și posibilitățile laboratorului (tabel nr. XLII).

— coloratia Gram și testul pentru mobilitate ;

— testarea oxidazei, cu menținerea, nu toate pseudomonadele sînt oxidază pozitive. Pseudomonas aeruginosa și fluorescens produc oxidază ;

— testarea în mediul Hugh-Leifson capacitatea de scindare oxidativă a glucozei, lactozei, maltozei ;

— testarea posibilității de utilizare metabolică a zaharozei, manozei, manitei, xilozei, galactozei și fructozei ;

— testarea capacității de hidroliză a esculinei ;

— testarea capacității de scindare a ureei ;

— testarea capacității de reducere a nitraților ;

— testarea prezenței/absenței lizin-ornitin-decarboxilazei și arginin-dehidrolazei ;

— testarea capacității de scindare a gelatinei ;

— testarea capacității de creștere la 42°C ;

— testarea creșterii în prezența unei concentrații de Na 6,5%.



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XLII*

**Caracterele diferențiale ale unor Pseudomonade de interes medical**

| | *Pa* | *Pf* | *Pp* | *Pm* | *Pc* | *Ps* | *Pput* | *Pps* | *Pma* | *Pac* | *Ppa* | *Pv* | *Pal* | *Pd* | *Pt* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| O-F-test | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | − | − | − |
| Fluorescență | + | + | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Arginindehidrolaza | + | + | + | − | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − |
| Indofenoloxidaza | + | + | + | − | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ONPG | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Lizindecarboxilaza | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Esculina | − | − | − | + | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | − |
| $H_2S$ (TSI sau SIM) | − | − | − | − | − | − | + | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Ornitindecarboxilaza | − | − | − | − | − | − | + | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Amidon | − | − | − | − | − | − | − | − | v | − | − | − | − | − | − |
| NaCl 6,5 % | − | − | − | − | − | − | + | − | − | − | − | − | − | − | − |
| N-gaz din nitrați | v | − | − | − | − | + | − | + | | − | − | − | − | − | − |
| Colonii crenelate | − | − | − | − | − | + | − | + | | − | − | − | − | − | − |
| Colonii galbene | − | − | − | + | − | − | − | v | | − | − | − | − | − | − |
| Brunificarea mediului | − | − | − | v | − | − | − | − | − | − | v | − | v | − | − |
| McConkey — agar | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cetrimid — agar | + | + | + | − | + | − | − | − | − | − | + | − | v | − | − |
| Creștere la 42°C | + | − | − | + | v | − | + | + | − | − | + | + | + | + | − |
| Polimixina — rezistență | − | − | − | − | + | − | − | + | | − | − | + | − | + | − |
| Lecitinaza | v | + | − | − | + | v | − | + | | − | − | − | − | − | − |
| Gelatinaza | v | + | − | + | v | − | + | + | − | − | − | + | − | + | − |
| DNAaza | v | − | − | + | − | − | + | − | | − | − | − | − | + | − |
| Nr. flageli | 1 | 1 | 1 | 1 | 1–3 | 1 | 1 | 1 | | 1 | − | − | − | 1 | 1 |

Pa. = Ps. aeruginosa
Pf. = Ps. fluorescens
Pp. = Ps. putida
Pm. = Ps. maltophilia
Pc. = Ps. cepacia
Ps. = Ps. stutzeri
Ppu. = Ps. putrefaciens
Pps. = Ps. pseudomallei
Pma. = Ps. mallei
Pac. = Ps. acidovorans
Ppa. = Ps. pseudoalcaligines
Pv. = Ps. vesiculare
Pal. = Ps. alcaligenes
Pd. = Ps. diminuta
Pt. = Ps. testosteroni
\+ = test pozitiv (90 %)
− = test negativ (90 %)
v = topuri diferite, + sau −
Clasificare după I. D. Costin (Diagnostica Merck)

Scanned with OKEN Scanner

## Bacterii Gram negative
## Schema de lucru (I. D. Costin)

| *Familie / Grup / Gen* / *Text / Caracter* | *Neisseriaceae* | *Enterobacter Pasteurella Chromobacterium* | *Actinobacillus Pasteurella* | *Actinobacillus* | *Pasteurella Aeromonas* | *Vibrio* | *Pseudomonas Leoffflerella* | *Chromobacterium* | *Loeffrerella Brucella* | *Brucella Moraxella Bordetella* | *Bordetella Alcaligenes Lophomonas* | *Bordetella Haemophilus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dezvoltare aerobă pe medii uzuale simple în 24 ore | d | + | d | + | + | + | + | + | d | d | d | d |
| Forma S = sfera<br>B = bastonaș | S | B | B | B | B | (B) | B | B | B | B | B | B |
| Mobilitate | − | d | − | − | d | + | + | + | − | − | d | − |
| Catalaza | d | + | + | − | + | + | + | + | + | + | + | nt |
| Oxidaza | d | − | − | − | + | + | + | − | − | d | + | d |
| Glucoză (acid) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | − | − | nt |
| Glucoză O = oxidativ<br>F = fermentativ | d | F | F | F | F | F | O | O | O | − | − | nt |

LEGENDA: + = 80—100 % din tulpini dau rezultat pozitiv;
d = 20— 80 % din tulpini dau rezultat pozitiv;
− = 0— 20 % din tulpini dau rezultat pozitiv;
nt = nu se poate determina pe medii uzuale simple, fără produse biologice.



Scanned with OKEN Scanner

Izolarea primară a germenului este indicată la capitolul „puritatea medicamentului".

d) *Germeni anaerobi Gram pozitivi sau Gram negativi.* Avînd în vedere implicarea unor germeni anaerobi în patologia umană, prezentăm cîteva considerații și schematic, modalitatea de izolare primară din produsele cosmetice. Contrar produselor patologice care pot conține număr mare de germeni anaerobi sub formă vegetativă, produsele cosmetice conțin în general, formele de rezistență (sporii) ale acestora. Din aceasta deducem o primă concluzie : este util să folosim un mediu de cultură care să favorizeze germinarea sporilor și dacă este cazul să inactivăm parțial produsul pentru a îndepărta formele vegetative ale altor germeni. Pe lîngă aceasta, trebuie să menționăm dificultatea de a identifica și a încadra în taxonomie un germen anaerob, datorită unor tehnici mai complicate și nu de neglijat, confuzia care încă mai există cu privire la clasificarea lor.

Pentru a ușura orientarea microbiologului, prezentăm metodologia de identificare (sumară) separat pentru anaerobii Gram pozitivi sporulați, continuînd cu unele precizări cu referire la anaerobii Gram negativi sau Gram pozitivi nesporulați (tabelul nr. XLIII și XLIV).

— Microorganisme anaerobe Gram pozitive sporulate :

• se însămînțează 1 g/ml din produsul supus cercetării sau dacă nu este posibil (cantitate insuficientă), se însămînțează din diluția inițială 1 ml în mediul universal nr. 1 I.C., repartizat în eprubete cîte 15 ml, peste care s-a depus 1 ml oleu de parafină steril. Inocularea se efectuează cu deosebită atenție, specifică pentru anaerobi :

• termostatare 7 zile la 35—37°C ;

• cultura se examinează zilnic ;

• din cultura crescută se efectuează însămînțări direct pe mediile Nagler și Willis-Hobbs. Concomitent, efectuăm o însămînțare și pe geloză înclinată pentru controlul prezenței germenilor aerobi.

• termostatare 18—24 ore la 35—37°C în condiții de anaerobioză (exceptînd geloza simplă), folosind procedeul pirogalolului alcalin sau prin sistemul „anaerocult" A, C sau P ;

• aspectul coloniilor pe mediile Nagler și Willis-Hobbs cît și comportamentul lor enzimatic furnizează primele criterii de diagnostic al genului Clostridium ;

• pentru determinarea speciei se apelează total sau numai fragmentar la următoarele teste : lichefierea gelatinei, albușului de ou, serului coagulat ; comportamentul față de laptele turnesolat (coagulare, fermentare, reducere, gaz), producere de indol, reducerea nitraților și nitriților, comportamentul față de următoarele zaharuri : glucoza, maltoza, zaharoza, lactoza, fructoza și galactoza. Pentru testarea fermentării zaharurilor recomandăm utilizarea mediului CHO (Anaerobe Fermentation Medium), sau mediul V.L. lichid (Beerens și Tahon-Castel), iar la nevoie se poate utiliza un bulion simplu (plus zaharul respectiv), sau apă peptonată dublu concentrată, condiționate și termostatate în condiții de anaerobioză.

• colorația Gram este utilă în orice etapă de diagnostic.

— Microorganisme anaerobe nesporulate :

• în acest grup intră o gamă largă de germeni, cu aspect morfologic diferit : coci, bacili, spirili, vibrioni, dintre care unii Gram negativi sau Gram pozitivi ;



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. XLIV*

## Bacterii Gram pozitive
## Schema de lucru (I. D. Costin)

| *Familie / Grup / Gen* / *Test / Caracter* | *Staphilococcus Aerococcus* | *Micrococcus* | *Micrococcus* | *Aerococcus Leuconostoc Streprococcus* | *Streptococcus* | *Listeria* | *Corynebacterium* | *Kurthia* | *Erysipelothrix Actinomices Lactobacillus* | *Bacillus* | *Clostridium* | *Mycobacterium Nocardia* | *Nocardia* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dezvoltare aerobă sau microaerofilă în 24 ore pe medii uzuale simple | + | + | + | + + d | + | + | d | + | + − d | + | − | + − | + |
| Forma S = sfera B = bastonaș | S | S | S | S | S | B | B | B | B | B | B | B | B |
| Acidorezistența | − | + | − | − | − | − | − | − | − | − | − | + | − |
| Spori (prezența) | − | − | − | − | − | − | − | − | − | + | + | − | − |
| Mobilitate | − | − | − | − | + | + | − | + | − | d | d | − | − |
| Catalază | + | + | + | − | − | + | + | + | − | + | − | d | + |
| Glucoza (acid) | + | + | − | + | + | + | d | − | + | d | d | + | + |
| Oxidază | − | − | − | − | − | − | − | − | − | d | − | − | − |
| Glucoză F = fermentativ O = oxidativ | F | O | − | F | F | F | F | − | F | d | F | O | O |



Scanned with OKEN Scanner

- izolarea și identificarea acestor germeni este mult mai dificilă ;
- din mediul universal aerob-anaerob nr. 1 I.C., însămînțăm pe medii de cultură diferențiale (geloză sînge, geloză-sînge-bilă, geloză-sînge-verde de malahit, geloză-tioglicolat după Brewer) ;
- termostatare în condiții de anaerobioză 18—24 ore la 35—37°C ;
- coloniile crescute se examinează și se notează toate aspectele culturale ;
- coloratia Gram este foarte utilă pentru alegerea serului de teste biochimice în scopul încadrării în gen și eventual specie.

În concluzie, menționăm că în cazul cercetării produselor cosmetice și chiar farmaceutice, în scop de puritate microbiologică, este suficient dacă semnalăm prezența germenilor anaerobi și dacă sîntem mai exigenți continuăm studiul pentru a identifica germenii anaerobi cunoscuți patogeni, în special Clostridium perfringens pentru anaerobii sporulați și Bacteroides fragilis pentru anaerobii nesporulați.

## Bibliografie


1. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ed. a VIII-a, 1974.
2. * * * — BIOS, Inst. Cantacuzino, 1981, nr. 1—2.
3. BÎLBÎIE V., POZSGY M. — Bacteriologie medicală, vol. 1, 2, Editura Medicală, București, 1975.
4. BONDE J. G. — Quality Control of Media-Proceeding of the Symposium held on 6th and 7th September in Calas de Mallorca, 1979.
5. BRUCH W. CARL — Sterilizer and sterility assurance standards — Congresul internațional de microbiologie, München, 1978.
6. BOTEANU S. ELENA — Practica farmaceutică, 1973, 3, 107—121.
7. BOTEANU S. ELENA — Practica farmaceutică, 1973, 6, 127—132.
8. BOTEANU SILVIA, GHERGHINIU ELENA — Practica farmaceutică, nr. 2, 1979, 13—14.
9. BÜHLMANN X., BRUXIN H., VISCHER A. W. — Proceedings of the 2nd Symposium of the International Association of Veterinary Food Hygienists (I.A.V.G.H.), Basel, 15—21 V, 1960.
10. BUZUGÂNY CL., TĂUTU N., PĂSCULESCU P., SURTEA E., ROMAN E., PÂRÂU N. — Practica farmaceutică, nr. 2, 1979, 103.
11. COSTIN I. D. — Spezille Medizinische Mikrobiologie, Zent. bl. Bakteriol. 1969, 219.
12. COSTIN D. I., KAPPNER M., SCHMIDT W. — Forum microbiologie, 1983, 6, 351—353.
13. COSTIN D. I., GRICO S. — Zentbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. A., 1974, 227, 483—521.
14. COSTIN D. I. — Med. Lab. 1977, 20, 8, 197—317.
15. COSTIN D. I. — Viața Med. 1965, 12, 12, 843—848.
16. COWAN S. T., STEEL K. J. — Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press, Cambridge, 1974.
17. * * * — DGHM, Verfahrenscrichtlinien Für die Mikrobiologische Diagnostik, vol. 1, Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.
18. DONY J. — Rev. Inst. Pasteur (Lyon), 1978, 11, 4, 569—591.
19. * * * — Farmacopeea Română, ed. a IX-a.
20. FARMER și colab. — Biochemical reactions of the maned species, Biogroup and Enteric Group of the family Enterobacteriaceae.
21. HUGO B. W. — J. Appl. Bacteriol. 1967, 1, 17—50.
22. ISTRĂTESCU-GUTI L., GHERGHINIU E. — Practica farmaceutică, 1970, 3, 3—18.
23. LEIFFSON EINAR — International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy, 1962, 12, 4, 161—170.
24. LENNETTE H. E., SPAULDING H. E., TRUANT P. J. — Manual of clinical microbiology, Am. Soc. Microbiol. USA, 1974.

# 6. Controlulul microbiologic în unitățile sanitare

## 6.1. INTRODUCERE

Controlul microbiologic în unitățile sanitare se efectuează ca o parte din sistemul de măsuri de prevenire și combatere a infecțiilor intraspitalicești. Ca atare, considerăm necesar să reamintim unele noțiuni privind infecțiile intraspitalicești.

Infecțiile intraspitalicești sînt îmbolnăviri manifeste clinic, de natură infecțioasă, contractate în timpul spitalizării de către bolnavi sau alte persoane asistate. Aceste îmbolnăviri pot apărea în timpul spitalizării sau după externare. Se consideră infecții intraspitalicești și infecțiile similare contractate de personalul sanitar în timpul activității sanitare în spital.

Infecțiile intraspitalicești se pot clasifica în două mari grupe :

— boli transmisibile comune cu alte colectivități ;

— infecții de gazdă cu receptivitate modificată.

*Primul grup cuprinde majoritatea bolilor transmisibile* cunoscute și mai ales infecțiile tractului respirator și bolile diareice. Frecvența lor poate fi mai mare decît în alte unități de cazare și alimentație colectivă, datorită posibilităților mai mari de a se acumula surse de infecție în spitale, iar gravitatea lor este de obicei mai mare datorită faptului că populația spitalizată cuprinde o densitate mai mare de persoane cu mare receptivitate decît populația generală:

— Exemple curente de astfel de infecții sînt gripa, infecțiile streptococice, bolile diareice, hepatitele virale, rujeola, varicela și altele. În funcție de situația epidemiologică a teritoriului în care este amplasat spitalul, nu sînt excluse febra tifoidă, dizenteria bacilară, holera etc.

În etiologia acestor infecții intervin microorganisme cu patogenitate recunoscută. Supraaglomerarea și deficiențele de igienă generală sînt factorii favorizanți ai acestui grup de infecții intraspitalicești, iar măsurile de prevenire și combatere a acestor boli în spital nu prezintă diferențe mari față de măsurile de prevenire și combatere în alte colectivități.

În activitatea de prevenire și combatere a acestor îmbolnăviri controlul microbiologic preventiv va trebui să ateste calitățile de potabilitate a apei distribuite în unitate, respectarea normelor privind calitatea alimentelor și condițiilor de sanitație de preparare și distribuire a alimentelor. Metodele de laborator utilizate sînt cele expuse la capitolele respective. De asemenea, controlul preventiv va trebui să cuprindă examenele de laborator la angajare și periodic ale personalului care asigură întreținerea



Scanned with OKEN Scanner

rezervorului și instalațiilor de apă potabilă, precum și a personalului blocului alimentar și oficiilor, biberoneriilor și bucătăriilor de lapte și spălătoriilor pentru depistarea unor eventuale surse de infecție și, prin neutralizarea lor, prevenirea unor izbucniri epidemice.

Pe lîngă acestea, în unele boli transmisibile, cum ar fi bolile diareice, laboratorul spitalului contribuie curent la stabilirea etiologiei cazurilor internate permițînd aplicarea măsurilor de izolare și tratament (cum este de exemplu, depistarea unor cazuri de dizenterie sau salmoneloze printre copiii internați cu enterită în secțiile de pediatrie). Aceasta înseamnă că laboratorul spitalului, prin stabilirea etiologiei unor boli transmisibile cu care bolnavii se internează, are un rol deosebit în supravegherea acestor boli și stabilirea măsurilor de neutralizare a surselor de infecție prin izolare și tratament, ceea ce contribuie la prevenirea răspîndirii lor ulterioare printre alți bolnavi spitalizați sau la personalul de îngrijire.

Astfel, în primul grup de infecții intraspitalicești, grupul bolilor transmisibile cu agenți patogeni recunoscuți, întîlnite și în colectivitate, activitatea de supraveghere cu laboratorul a calității apei și alimentelor și de depistare a surselor de infecție, are scopul prevenirii unor izbucniri epidemice transmise prin apă, alimente sau prin contact.

*Cel de-al doilea grup de infecții intraspitalicești* cuprinde îmbolnăviri de natură infecțioasă care apar la persoane cu mare receptivitate generală sau reducerea predominant locală a puterii de apărare a organismului. Gazde expuse la astfel de infecții sînt nou-născuții și mai ales prematurii, copiii cu malnutriție proteocalorică, persoanele cu defecte imunologice, anemii, neoplazii, cele supuse tratamentelor imunosupresive (corticosteroizi, alchilanți, radiații ionizante), cele cu soluții de continuitate ale țesuturilor, ca urmare a unor stări fiziologice (lăuzia), traumatisme sau intervenții chirurgicale. Explorările endoscopice și utilizarea cateterelor pentru explorări sau terapie, utilizarea aparaturii de terapie intensivă și extinderea terapiei medico-chirurgicale agresive care au adus mari succese în medicina modernă, se asociază cu creșterea riscului de infecții intraspitalicești datorită creșterii riscului de introducerea microorganismelor în cavități și țesuturi în mod normal sterile, cît și efectului imunodepresiv al intervențiilor chirurgicale.

În acest grup de infecții intraspitalicești se întîlnesc :

— infecțiile urinare
— infecțiile de plagă chirurgicală
— infecțiile postpartum
— o parte din infecțiile tractului respirator
— enteritele postantibiotice
— bacteriemiile după perfuzii și bacteriemiile secundare.

În etiologia acestor infecții intervin și microorganismele patogene, cum ar fi, streptococul hemolitic sau Staphylococcus aureus, ca și microorganisme condiționat patogene ca Staphylococcus epidermis, streptococul grup D, Es. coli nepatogen, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa sau pneumocystis. O enumerare a principalelor microorganisme întîlnite în infecțiile intraspitalicești este prezentată de Parker în Ghidul metodelor de laborator aplicabile la infecțiile intraspitalicești.

Pe lîngă receptivitatea modificată, și în acest grup de infecții intraspitalicești, o verigă importantă este reprezentată de calea de transmitere



Scanned with OKEN Scanner

constituită mai ales, din instrumente, materiale sanitare și mîinile personalului și, bineînțeles nu trebuie neglijat rolul surselor de infecție existente printre bolnavi și personal.

În prevenirea acestor infecții, măsurile se concentrează pe aplicarea tehnicilor de asepsie și antisepsie, concretizate pentru fiecare procedură, precum și pe măsurile de izolare a surselor și izolare de protecție a marilor receptivi și pe supravegherea continuă a infecțiilor.

Rezultă că activitatea de control microbiologic preventiv trebuie să fie orientată spre verificarea principalelor condiții de asepsie (controlul sterilizării și sterilității materialelor sanitare și soluțiilor sterile), controlul eficienței măsurilor de antisepsie (controlul soluțiilor antiseptice : eficiența antisepticelor pe tegumente), controlul preparatelor aseptice medicamentoase și preparatelor aseptice alimentare folosite în alimentația nou-născutului și sugarului.

De asemenea, aici se cuprinde controlul microbiologic al soluțiilor dezinfectante și determinări ale eficienței dezinfecției.

Pe lîngă determinările enumerate, care se efectuează de către laboratoarele centrelor sanitaro-antiepidemice cu ocazia controalelor în spitale și de către laboratoarele spitalelor în cadrul autocontrolului, acestora din urmă le revine și participarea la supravegherea infecțiilor intraspitalicești prin stabilirea diagnosticului etiologic și la prevenire, prin determinările de laborator ale eficienței măsurilor de prevenire adoptate.

## 6.2. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL STERILIZĂRII

Sterilizarea constă în distrugerea tuturor microorganismelor (inclusiv a formelor sporulate), controlabilă prin metodele stabilite de autoritățile sanitare naționale.

Pentru sterilizarea materialelor sanitare sînt folosite sterilizarea cu abur saturat sub presiune în diferite tipuri de autoclave și sterilizarea prin căldură uscată folosind etuvele cu aer cald. Pentru materialele care nu suportă sterilizarea prin căldură se folosesc sterilizatoare cu oxid de etilen sau cu formol, precum și sterilizarea prin radiații ionizante.

Prin controlul sterilizării se înțelege, controlul ciclului de sterilizare prin teste care se supun sterilizării odată cu încărcătura de materiale sanitare.

### 6.2.1. Controlul sterilizării la autoclave cu abur sub presiune

În prezent, sarcina personalului sanitar care trebuie să efectueze controlul microbiologic al sterilizării la autoclav este mult ușurată de existența testelor autorizate de către autoritatea națională de control. Prin normele din țara noastră, se recomandă efectuarea controlului sterilizării lunar, precum și după orice intervenție efectuată pe aparat. În țara noastră se utilizează produsul Stearotest 120 pe care îl realizează și



Scanned with OKEN Scanner

îl livrează Institutul „Cantacuzino". Produsul Stearotest 120 este o suspensie de spori de Bacillus stearotermophillus în soluție nutritivă cu indicator de pH. Conținutul fiolelor în care este prezentat este limpede, de culoare violet.

Modul de utilizare : se introduc în autoclav fiole de Stearotest 120 așezate printre obiectele din fiecare pachet al încărcăturii supuse sterilizării la 120°C. Se efectuează sterilizarea la parametrii indicați (120°C timp de 30 minute) ; după sterilizare, fiolele sînt incubate la 56°C timp de 24 ore (la termostat sau baie de apă).

Rezultatele se interpretează astfel :

— menținerea transparenței și culorii violete a fiolei indică o sterilizare corectă. Sporii de Bacillus stearotermophillus au fost distruși, nu au crescut, nu au tulburat mediul și nu s-a produs modificarea pH-ului după incubare ;

— virajul de la violet la galben al indicatorului de pH și opacifierea conținutului arată că sterilizarea nu a fost eficace, sporii de Bacillus stearotermophillus nu au fost distruși în totalitate și după incubare au crescut producînd modificările menționate.

În cazul cînd fiolele sînt expuse în autoclav la temperaturi de sterilizare peste 120°C și același timp de sterilizare de 30 de minute, apar modificări de culoare de la violet roșcat pînă la galben ale conținutului fiolelor. Aceste modificări se datoresc degradării chimice a substratului datorită temperaturii ridicate ; ele arată că sporii au fost distruși și nu mai este necesară incubarea fiolelor care prezintă astfel de modificări.

Dacă însă testul este expus la o temperatură de sterilizare de peste 120°C, dar cu un timp de sterilizare mai redus (exemplu : la temperatura de sterilizare de 134°C și timpul de sterilizare de 4—5 minute conținutul fiolelor rămîne violet limpede). În aceste cazuri fiolele se incubează 24 h la 56°C, iar citirea și interpretarea se efectuează ca și în cazul sterilizării la 120°C timp de 30 minute.

În alte țări, pentru controlul sterilizării la autoclav se utilizează diferite teste bacteriologice produse de diferite firme și prezentate sub formă de suspensie de spori test sau benzi de hîrtie impregnate cu spori. În toate aceste produse germenele test pentru controlul sterilizării cu abur sub presiune este Bacillus stearotermophillus, iar modul de utilizare este indicat de producător.

Avantajul controlului bacteriologic al sterilizării constă în fidelitatea rezultatelor. Aceasta rezultă din aprecierea general acceptată că rezistența bacilului stearotermophillus la căldura umedă depășește rezistența oricărui agent patogen cu o margine de siguranță apreciabilă.

Astfel de exemplu, în condiții de umiditate foarte mare sporii de Bacillus stearotermophillus sînt de 50 000 de ori mai rezistenți la căldură, decît sporii de Cl. botutulinum tip E.

Datorită acestui avantaj, testele cu spori sînt indicate pentru etalonarea și verificarea testelor chimice indicatoare de timp și temperatură, la controlul noilor tipuri de autoclave și în practică la determinarea punctelor mici ale incintei autoclavei, la stabilirea mărimii și densității pachetelor de textile, a încărcăturii maxime ale incintei la depistarea pungilor de aer în cazurile de împachetare sau încărcare greșită, precum și la



Scanned with OKEN Scanner

controlul diferitelor tipuri de împachetare a materialelor supuse sterilizării. Această metodă de control este indicată, de asemenea, după diferite intervenții pentru remedierea defecțiunilor ce pot surveni în funcționarea autoclavei în timpul exploatării.

Este recomandabil ca medicul sau personalul sanitar care efectuează acest control să fie asigurat de către inginerul sau tehnicianul de întreținere, că aparatul controlat funcționează la parametrii normali și să verifice respectarea instrucțiunilor de utilizare ale autoclavei. El trebuie, de asemenea, să verifice dacă sînt respectate condițiile de împachetare stabilite prin norme.

În aceste condiții, prin introducerea testului în fiecare pachet în centrul pachetului, în cazul încărcăturilor textile se verifică dacă la temperatura și timpul de sterilizare utilizate, aburul a pătruns uniform în toate pachetele și a realizat sterilizarea. Dacă toate testele rămîn sterile înseamnă că s-a realizat în toate pachetele pătrunderea aburului și expunerea suficientă în timp la temperatura de sterilizare, pentru ca procesul de sterilizare să fie eficace. Dacă în unul sau mai multe pachete, fiolele rămîn cu spori viabili, înseamnă că pătrunderea aburului nu a fost suficientă, datorită densității prea mari a pachetului sau unei greșeli în utilizarea aparatului (insuficienta evacuare a aerului, nerespectarea timpului sau temperaturii de sterilizare recomandate). Desigur că acest procedeu nu poate fi utilizat curent pentru controlul fiecărui ciclu de sterilizare. El se recomandă mai ales pentru stabilirea modului de încărcare corectă, de împachetare corectă și de funcționare eficientă a autoclavei. Pentru controlul fiecărui ciclu de sterilizare, metoda cea mai practică este inscripția automată a temperaturii fiecărui ciclu, ceea ce este posibil la autoclave cu dispozitive de înregistrare a temperaturii în tot cursul ciclului de sterilizare. În lipsa acestora, benzile indicatoare de timp și temperatură (exemplu, T.S.T., 3 M, Chemdi, Proper etc.), pot permite citirea corectitudinii sterilizării la sfîrșitul fiecărui ciclu.

Totuși, ținînd seama de fidelitatea metodei și de importanța asigurării condiției de sterilitate, există autori care recomandă controlul microbiologic săptămînal al sterilizării. În acest scop este practicată utilizarea unui pachet (sau unei casolete cu teste puse între straturile de materiale textile ; această casoletă se va plasa în apropierea orificiului de evacuare a aburului din camera (cazanul) de sterilizare, unde se consideră, de obicei, că este punctul cel mai rece al autoclavei, dacă aceasta funcționează fără defecțiuni.

După expunerea la ciclu, testele se scot, se incubează și se citesc, potrivit instrucțiunilor de utilizare.

### 6.2.2. Controlul sterilizării cu aer cald

Pentru controlul microbiologic al sterilizării cu aer cald se folosesc teste preparate din benzi de hîrtie sau pînză impregnată cu spori de Bacillus subtilis. Acestea pot fi găsite în comerț ca produse ale unor firme (exemplu, AMSCO-SPORDI) sau preparate în laborator.

Un procedeu simplu pentru prepararea testelor constă în cultivarea tulpinii de bacil subtilis într-un balon cu bulion simplu incubat la 37°C



Scanned with OKEN Scanner

timp de 3—4 zile. Vălul format se trece într-un balon steril preparîndu-se cu apă distilată o suspensie de $10^6$ spori/ml. Controlul concentrației se face la scara nefelometrică. Testele se prepară prin impregnarea unor bucăți de pînză la 0,6/3 cm, care se usucă în plăci Pétri sterile, apoi se introduc, cîte una în tuburi de 100/10 și pot fi utilizate pînă la 6 luni de la preparare.

Pentru utilizare, 2 tuburi cu teste se introduc într-o placă Pétri cu diametrul de 12 cm. Placa, cu cele 2 teste se împachetează în hîrtie între 2 plăci de același diametru. Testul astfel preparat are o rezistență termică similară cu un test care a fost preparat în anumite condiții în laboratorul nostru și care a prezentat următoarele caracteristici de rezistență termică determinabile în orice laborator de microbiologie :

a) Timpul maxim de supraviețuire și timpul minim de distrugere a sporilor din teste în cazul plasării testelor într-o placă Pétri sau într-un pachet de 3 plăci Pétri ambalate în hîrtie, expuse fiecare în mijlocul etuvei de 100 $cm^3$ cu ventilator, preîncălzite la temperaturile de sterilizare :

*Tabel nr. XLV*

| *Temperatura de sterilizare* | *180°C* | | *170°C* | | *160°C* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Modul de împachetare | TS | TD | TS | TD | TS | TD |
| Într-o placă Pétri | 20′ | 23′ | 25′ | 30′ | 40′ | 45′ |
| În 3 plăci Pétri împachetate în hîrtie | 45′ | 50′ | 50′ | 60′ | 80′ | 85′ |

TS = timp maxim de supraviețuire
TD = timp minim de distrugere

b) Timpul maxim de supraviețuire (TS) și timpul minim de distrugere (TD) a sporilor împachetați și plasați ca și în experimentele prezentate de la punctul *a*, dar expuși la întregul ciclu de sterilizare (încălzire de la temperatura mediului ambiant sau de la maximum 70°C la temperatura de sterilizare, menținere, la temperatura de sterilizare și răcire la 80—70°C) ;

*Tabel nr. XLVI*

| *Temperatura de sterilizare* | *180°C* | | *170°C* | | *160°C* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Modul de împachetare | TS | TD | TS | TD | TS | TD |
| Într-o placă Pétri | 0 | 0 | 10′ | 15′ | 20′ | 25′ |
| În 3 plăci Pétri împachetate în hîrtie | 15′ | 20′ | 30′ | 35′ | 50′ | 55′ |



Scanned with OKEN Scanner

c) Timpul maxim de supraviețuire (TS) și timpul minim de distrugere (TD) a sporilor de Bacillus subtilis în teste așezate în pachete de de 3—4 plăci Pétri ambalate în hîrtie și plasate în diferite puncte ale unei încărcături normale (12 pachete pe fiecare raft inclusiv pe planșeu în etava de 100 $dm^3$ cu ventilator produse de I.I.T.M.

*Tabel nr. XLVII*

| *Temperatura de sterilizare* | *180°C* | | *170°C* | | *160°C* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Poziția testului în încărcătură | TS | TD | TS | TD | TS | TD |
| Centrul etuvei | 2′ | 3′ | 10′ | 15′ | 35′ | 40′ |
| Punctul cel mai nefavorabil sterilizării | 6′ | 7′ | 25′ | 30′ | 50′ | 55′ |

Din datele prezentate rezultă că într-un ciclu complet timpul cel mai mare de distrugere a testului împachetat în 3 plăci Pétri se observă atunci cînd încărcătura este minimă (numai testul). La o încărcătură normală, timpul de sterilizare se scurtează. Acesta se datorește faptului că la încărcătura normală, în ciclul complet, timpul de încălzire și timpul de răcire se prelungesc, ceea ce se cumulează la energia totală necesară distrugerii sporilor. Dar chiar în punctul cel mai rece al etuvei, timpul de supraviețuire într-o încărcătură normală este mai mic decît în încărcătura minimă.

Pentru rațiuni practice (posibilitatea erorii maxime de practică a sterilizării, adică de expunere la sterilizare a unui obiect numai după ce aparatul a atins temperatura de sterilizare), noi am determinat timpii de supraviețuire și de distrugere a sporilor în test în aceste condiții (tabel nr. XLV) și în practică recomandăm verificarea în aceste condiții a testului preparat pentru controlul sterilizării cu aer cald. Dacă testul preparat (bucățile de pînză impregnate cu suspensia de spori $10^6$/ml uscate, introduse aseptic în tuburi apoi în placă Pétri și apoi placa în pachet de 3 plăci ambalate în hîrtie), rezistă timp de 40—45 minute în condițiile experimentului din tabelul nr. XLVI, testul poate fi utilizat la controlul sterilizării cu aer cald.

Testul preparat, după controlul lotului, se poate utiliza astfel : se introduc pachetele cu teste în diferite puncte ale etuvei o dată cu încărcătura ce urmează a fi supusă sterilizării ; la terminarea ciclului de sterilizare pachetele cu teste sînt trimise laboratorului. În laborator, în tubul conținînd testul se adaugă bulion simplu (1/2 pînă la 1/3 din tub). Urmează incubarea la 37°C timp de 7 zile. Utilizarea a 2 tuburi pentru fiecare test elimină orice posibilitate de eroare în interpretarea rezultatelor. Testarea sterilizării la etuva cu aer cald în mai multe puncte este indicată în controlul noilor tipuri de aparate, pentru verificarea parametrilor de lucru și performanțelor indicate de producător. Metoda se recomandă, de asemenea, pentru stabilirea modului de încărcare în cazul încărcăturilor de sticlă sau încărcăturilor metalice cu diferite tipuri de împachetare (tabel nr. XLVII).



Scanned with OKEN Scanner

Se știe că în cazul etuvelor destinate sterilizării, una din caracteristicile cele mai importante este gradientul de temperatură, care se determină cu termocupluri în condiții standardizate. În general, sînt considerate bune, etuvele cu un gradient de temperatură sub 5°C. Realizarea unui astfel de gradient depinde mai ales de buna funcționare a ventilatorului și de capacitatea etuvei. În etuvele fără ventilator nu se realizează acest gradient și utilizarea unor astfel de etuve nu este recomandată în prezent.

În etuva cu ventilator, în exploatare, diferențele de temperatură în interiorul etuvei vor depinde și de modul de încărcare. De aceea, este recomandabil să se utilizeze încărcătură timp, care să asigure o bună circulație a aerului cald printre pachete. Odată stabilite tipurile de încărcătură, se testează bacteriologic după metoda indicată care sînt punctele reci, punctele în care pentru un anumit tip de încărcătură, se observă cel mai lung timp de supraviețuire a sporilor din teste. Odată cunoscute punctele reci ale unei etuve pentru un anumit tip de încărcătură, este suficient controlul bacteriologic prin plasarea pachetului cu teste în punctul rece și expunerea lui la întregul ciclu de sterilizare. Aceasta se efectuează periodic pentru fiecare etuvă utilizată. După unii autori, săptămînal pentru fiecare etuvă.

Pentru controlul fiecărui ciclu pot fi utilizate teste chimice de timp și temperatură, cum ar fi, tuburile Browne, benzile 3 M.

În lipsa altor teste chimice se poate utiliza testul cu glucoză și citrat. Soluția se prepară la farmacie sau în laborator, după formula următoare : se dizolvă în 500—600 ml de apă distilată, încălzită la 40—50°C, citrat trisodic 30 g și glucoză 30 g ; după dizolvarea completă se adaugă HCl N/1 în cantitate de 10 ml ; se adaugă apă pînă la 100 ml. Se obține o soluție cristalină, incoloră, care se repartizează cîte 2,5 ml în flacoane goale provenite din ambalaje de antibiotice, după ce au fost perfect curățate și uscate. La temperatura de 123°C soluția virează în galben după o expunere de 30 de minute. Virajul culorii este datorat caramelizării glucozei, reacție dependentă de temperatură și timp. Creșterea temperaturii peste 123°C cu același timp de expunere produce caramelizarea mai avansată, respectiv culoarea brună a soluției. Testul cu glucoză și citrat se practică pentru fiecare ciclu de sterilizare la autoclav. De obicei, testul se pune într-una din cutiile de instrumente, materiale de cauciuc sau casoletă cu materiale textile, care se amplasează în punctul cel mai rece al autoclavului și se supune astfel ciclului de sterilizare. După efectuarea sterilizării, testul se scoate și se citește, iar cutia, casoleta sau pachetul, în care a fost amplasat testul, se resterilizează.

### 6.2.3. Controlul sterilizării cu oxid de etilen, formol sau radiații ionizante

Pentru controlul sterilizării prin procedee care folosesc acești agenți chimici se utilizează preparate de spori de Bacillus subtilis var. globigii în concentrație de $10^6$ impregnați pe benzi de hîrtie plasate în plicuri ; după terminarea ciclului de sterilizare se verifică creșterea sau absența



Scanned with OKEN Scanner

creșterii bacilului subtilis în aceleași condiții care au fost arătate pentru controlul sterilizării cu aer cald. Controlul sterilizării cu oxid de etilen este recomandat pentru fiecare ciclu de sterilizare.

Există în comerț teste produse de unele firme (exemplu, AMSCO-SPORDI), sub formă de benzi impregnate cu spori de Bacillus stearotermophillus și Bacillus subtilis care pot fi utilizate în controlul microbiologic al sterilizării, prin oricare din metodele de sterilizare folosite.

Pentru uzul cititorilor care efectuează controlul sterilizării, considerăm necesară menționarea cîtorva noțiuni, cum ar fi :

— ciclul de sterilizare = totalitatea timpilor de lucru de la începerea funcționării aparatului de sterilizare și pînă la terminarea sterilizării ;
— timpii ciclurilor de sterilizare la autoclav — a) preîncălzire, b) purjare, c) timp de sterilizare, d) uscare ;
— timpii ciclului de sterilizare la etuvă : a) încălzire, b) sterilizare, c) răcire ;
— timpul de sterilizare este durata în care sterilizatorul (etuva sau autoclavul) se menține la temperatura de sterilizare ;
— test de etanșeitate a autoclavului = menținerea presiunii negative de minimum 0,8 bari pe toată perioada de uscare (15′) ;
— umiditate maximă admisă a textilelor sterilizate = 5%, optim 2%, se determină potrivit normelor prevăzute în Ordinul Ministerului Sănătății nr. 190/1982, publicat în Buletinul Ministerului Sănătății nr. 6/1982.

Cauzele umidității crescute a materiilor textile supuse sterilizării sînt de obicei următoarele :

— neefectuarea timpului de preîncălzire ;
— scăderea presiunii apei în rețeaua de apă în timpul de uscare ;
— calitatea necorespunzătoare a aburului în cazul alimentării cu abur de la centrala termică ;
— întreruperea ciclului de sterilizare datorită întreruperii curentului electric.

## 6.3. CONTROLUL STERILITĂȚII MATERIALELOR SANITARE UTILIZATE ÎN TEHNICILE ASEPTICE

Definiția sterilității : prin material steril se înțelege materialul sanitar care a fost supus unui proces de sterilizare eficient și care se menține lipsit de orice microorganism ce poate fi pus în evidență prin metodele de control stabilite.

Pentru a efectua controlul sterilității materialelor sanitare, recoltarea probelor se efectuează de preferință direct pe mediile de cultură utilizate. De obicei, sînt necesare tuburi de 160/16 în care se repartizează 10—15 ml mediul 1 cu resazurină sau mediul 2 lichid, produse de Institutul „Cantacuzino". Pentru controlul sterilității unor obiecte mai mari se pot folosi tuburi mai mari 180/18 sau 200/20, sau baloane cu gît larg de 150/250 ml în care se repartizează 1/3—1/2 mediu, astfel încît obiectul controlat să fie complet imersionat.



Scanned with OKEN Scanner

Înainte de utilizare, mediul 1 se regenerează prin menținerea eprubetelor, respectiv baloanelor, cu mediul repartizat, în bain-Marie la 100°C timp de 10′ și răcire bruscă. Eprubetele, respectiv baloanele cu mediu, se incubează timp de 24—48 de ore la 37°C pentru a verifica dacă mediul nu este suprainfectat. Mediul 2 lichid se incubează la 25—28°C, iar vara la temperatura camerei. În același scop, din fiecare lot de tuburi turnat în aceeași zi, se mențin 2—3 tuburi la termostat (martori de sterilitate a mediului) pe toată perioada de incubare a probelor.

Este necesar, de asemenea, să se folosească martori de creștere pentru fiecare lot de fabricație, în cadrul termenului de garanție. Un martor de creștere pentru mediul 1 constă în 2 tuburi cu cîte 15 ml mediu care se însămînțează cu 0,1 ml dintr-o cultură de 24 de ore de Clostridium sporogenes cultivat pe același mediu din care se face o diluție de 1/200 000 și alte 2 tuburi cu aceași cantitate de mediu 1 în care se însămînțează cîte 0,1 ml dintr-o cultură de Staphilococcus aureus în același mediu diluată 1/10 000. În tuburile incubate timp de 48 de ore la 37°C bacteriile inoculate trebuie să crească. Martorul de creștere pentru mediul 2 constă în 2 tuburi cu cîte 15 ml mediul 2 care se însămînțează cu cîte 0,1 ml dintr-o cultură de 48 de ore de Candida albicans pe același mediu, diluată 1/10 000. Candida trebuie să se dezvolte normal în tuburile incubate la 24—28°C timp de 24 de ore.

### 6.3.1. Recoltarea probelor

Personalul care recoltează probele pentru controlul sterilității trebuie să fie echipat steril ca și personalul din spital cu care se efectuează recoltarea. De asemenea, este necesar ca personalul care recoltează să fie foarte bine antrenat în recoltarea aseptică.

Obiectele mici, ca acele de seringă, acele de puncție, acele de sutură, acele de stomatologie, materialele de sutură, compresele mici sau bucăți de compresă tăiate steril, tetine etc., se recoltează cu pensă sterilă și se introduc în eprubete, respectiv baloane, în condiții de strictă asepsie.

Este recomandabil ca din fiecare trusă controlată să se recolteze cel puțin 2—3 probe pe mediul 1 avînd astfel martor de recoltă.

Instrumentele chirurgicale, sondele sterile, se introduc cu capătul distal în recipientul cu mediu, se spală printr-o ușoară agitare, după care se scot și se aplică dopul la tub. Pentru cutiile cu instrumente mari se poate folosi următorul procedeu : se toarnă în cutie, peste instrumente, 20—30 ml de ser fiziologic steril care apoi se recoltează într-un balon și se lucrează în laborator. O altă metodă de recoltare în cazul instrumentelor mari constă în folosirea de tampoane sterile cu care se șterge o parte din suprafața obiectului controlat. Tamponul este însămînțat pe loc în tub cu mediul 1.

Pentru controlul catgutului, fiolele se aduc în laborator.

Recipientele sterile de sticlă, cum sînt biberoanele, se controlează prin introducerea unei cantități de mediu 1 egală cu 1/10 din volumul recipientului controlat, după care se pune dop steril, se înclină și i se dă



Scanned with OKEN Scanner

o mișcare de rotație sau se agită ușor. Recipientul cu mediul este astfel trimis la laborator unde se va incuba ca atare.

Pentru a se obține rezultate concludente asupra menținerii sterilității obiectelor controlate este indicat ca recoltele să se facă numai din truse sterile care nu au fost desfăcute anterior. Pe tabelul de probe se va menționa ora sterilizării și ora recoltării.

Pentru controlul apei sterile pentru spălare chirurgicală se pot obține rezultate concludente numai recoltînd probe, atît de la robinetul de control al aparatului de sterilizare a apei, cît și de la toți consumatorii. Apa se recoltează astfel :

— se flambează gura conductei de curgere a apei de la robinet, respectiv sita prin care curge apa ; dacă sita are diametru mare, se demontează înainte de începerea recoltei ;

— se lasă să curgă încet apa timp de 5 minute ;

— se recoltează în condiții aseptice cel puțin 2 probe de apă de la fiecare robinet, lăsînd să curgă 5—10 ml de apă într-un balon cu gura largă avînd cel puțin 50 ml de mediu sau 2 ml apă în tub de 160/16 cu 15 ml de mediu. În unele cazuri se pot recolta probe de 20—30 ml apă sterilă în tub sau balon care se transportă la laborator pentru însămînțare.

Însămînțarea în laborator a probelor pentru controlul sterilității se efectuează în boxă pentru controlul sterilității pregătită prin curățirea și dezinfecția suprafețelor prin ștergere cu soluție de cloramină 2% în dimineața zilei de lucru și expunerea la ultraviolete a mesei de lucru timp de minimum 30 minute — 1 oră. Personalul care efectuează însămînțările trebuie să fie echipat steril. Se vor respecta cu strictețe tehnicile aseptice de însămînțare.

În zona de lucru a boxei se vor respecta măsurile de curățenie și dezinfecție, precum și restricția totală a circulației personalului, ca și în zonele de preparare aseptică din laboratoarele farmaciilor.

Este, de asemenea, recomandabil ca măsurile de pregătire să fie testate prin controlul aeromicroflorei, în timpul lucrului, în boxa pentru controlul sterilității.

Din lichidele recoltate (apa sterilă pentru spălare chirurgicală, ser fiziologic din spălarea seringilor etc.) se însămînțează din fiecare probă cîte 2 ml pe 2 tuburi cu 15 ml mediu 1, respectiv 2 tuburi cu mediul 2.

### 6.3.2. Incubarea și citirea probelor

Tuburile, baloanele cu mediul 1 se incubează la 37°C timp de 7 zile. Probele cu materiale de sutură și pansament se însămînțează baloane cu cel puțin 100 ml mediu 1 și se incubează la 37°C timp de 15 zile conform Farmacopeei române.

Tuburile, baloanele cu mediul 2 se incubează la 24—28°C timp de 10 zile.

Probele se citesc zilnic în perioada de incubație notîndu-se creșterea sau absența creșterii. La probele la care se observă creștere pe mediul 1 se efectuează identificarea germenilor prin subcultivare pe geloză de



Scanned with OKEN Scanner

sînge, AABTL, McConkey și pe medii incubate în anaerobioză (geloză sînge, Müller-Hinton) după metoda recomandată de Institutul „Cantacuzino". Pe coloniile izolate se efectuează examenele morfologice și biochimice pentru identificare.

### 6.3.3. Interpretarea rezultatelor

Dacă din probele perechi recoltate ambele rămîn sterile, proba controlată se consideră sterilă. Se consideră steril și materialul din care una din probele perechi este sterilă și una nesterilă. În cazul cînd în ambele tuburi din aceeași probă s-a produs creștere, se analizează rezultatele identificării.

În cazul cînd în ambele probe s-a identificat același germene, proba se consideră nesterilă. Dacă în ambele probe perechi s-a produs creștere, dar microorganismele identificate sînt diferite, proba este neconcludentă și se repetă.

Pentru controlul soluțiilor sterile, medicamentelor și materialelor de sutură, numărul și mărimea probelor, tehnica de lucru și interpretarea rezultatelor sînt cele prevăzute în Farmacopeea română.

### 6.3.4. Controlul microbiologic al sistemului de împachetare și păstrare a materialelor sanitare sterile

Se introduc în casolete, respectiv în pachete și alte materiale supuse sterilizării, teste confecționate din bucăți de pînză de 1 $cm^2$ amplasate în diferite locuri care se apreciază că sînt mai expuse contaminării (de exemplu, în zona orificiilor și în zona de deschidere a capacului casoletei, sub straturile de textile, în cazul folosirii pachetelor de textile acoperite cu pînză etc.). După sterilizare, pachetul, casoleta se așază în locul stabilit pentru păstrare, unde se lasă timp de 24 ore, după care se trimite laboratorului de bacteriologie. Aici, testele sînt scoase în condiții de tehnică aseptică și introduse în mediile de cultură 1 și 2 folosind pentru fiecare test un tub ; incubarea, citirea și interpretarea probelor se fac potrivit prescripțiilor Farmacopeei române ed. a IX-a.

### 6.3.5. Indicații de control al sterilității

Controlul sterilității apei de spălare chirurgicală este indicat să se efectueze în următoarele situații :

— înainte de a da în funcțiune instalația de sterilizare și distribuție a apei sterile ;

— după orice intervenție efectuată pe conductele de distribuție ;



Scanned with OKEN Scanner

— pentru a verifica metodele de menținere a sterilității apei pe conducte ;

— periodic, cel puțin săptămînal ;

— în cadrul anchetelor epidemiologice.

Medicul care efectuează determinările va trebui, în colaborare cu tehnicienii de întreținere să stabilească mecanismul contaminării în cazul probelor nesterile pentru aplicarea măsurilor de remediere.

Indicații pentru controlul sterilității celorlalte materiale :

— verificarea procedeelor de împachetare ;

— verificarea condițiilor de menținere a sterilității stabilite prin norme ;

— periodic, cel puțin săptămînal, prin sondaje pe un număr de truse cu diferite tipuri de materiale ;

— în cadrul anchetelor epidemiologice.

## 6.4. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL EFICIENȚEI DEZINFECȚIEI MÎINILOR

Pentru controlul microbiologic al eficienței dezinfecției mîinilor au fost recomandate o serie de metode de testare a antisepticelor utilizate, unele aplicabile numai în laborator, altele aplicabile și în spital :

a) Metoda Colebroock și Maxted (1933) : pe fața dorsală a degetelor se stabilesc suprafețe de 1,5 $cm^2$ peste care se pun 2 picături din fiecare diluție de antiseptic. Se lasă să se usuce și nu se spală. După 2 ore se pune pe fiecare arie o picătură dintr-o suspensie de Staphylococcus aureus. După 10 minute de contact, suprafața se șterge cu un tampon steril, care se introduce în tub cu 10 ml bulion. Un ml din acest bulion se însămînțează pe o placă de geloză ; placa se incubează 48 de ore la 37°C după care se numără coloniile. Aprecierea eficienței se face în raport cu un antiseptic de eficiență cunoscută ;

b) Tehnica Price (1938) : sînt folosite 10 recipiente cu cîte 2 l de apă sterilă. Mîinile și brațele se freacă cu peria sterilă și un săpun obișnuit timp de 35 de secunde, după care se spală în primul bazin. Se repetă săpunitul cu peria timp de 35 secunde și spălarea succesivă în celelalte bazine. Din apa de spălare din cele 10 bazine se fac însămînțări pe geloză (exemplu, 1 ml prin încorporare pe geloză simplă), se incubează 48 h la 37°C după care se efectuează numărătoarea coloniilor. Se stabilește graficul de reducere a germenilor cu fiecare spălare. Ulterior, se repetă proba cu antisepticul investigat și se compară rezultatele.

Tehnica Price este greoaie de aplicat. În 1950 Cade recomandă o modificare, reducînd spălarea în 5 bazine. Tot în 1950, Browers propune o metodă mai ingenioasă : se spală mîinile cu apă și săpun de control după care se pun mănuși de cauciuc sterile care se poartă timp de 2 ore ; după aceea mănușile se scot și în fiecare din ele se introduce cîte 100 ml de apă sterilă ; se ia un ml de apă din fiecare mănușă și se însămînțează pentru numărătoare. A doua zi procedeul se repetă cu săpunul dezinfectant care se testează comparîndu-se rezultatele ;



Scanned with OKEN Scanner

c) În 1978, Darbord și colab., trecînd în revistă metodele de control microbiologic al curățeniei mîinilor, arată dificultățile tehnice ale metodelor cunoscute, mai ales pentru determinări cantitative. Autorii apreciază că tehnicile care folosesc spălarea mîinilor (tehnica Price cu modificările ulterioare) sînt greoaie și dificil de aplicat pe de o parte, iar pe de altă parte, metodele nu pot fi considerate reproductibile datorită diferențelor anatomice ale mîinilor examinate. În ceea ce privește procedeele care folosesc tamponul (exemplu, Colebroock și Maxted) ei apreciază că rezultatele sînt numai aproximativ cantitative din cauză că tamponul este mic, iar precizia suprafețelor tegumentare este variabilă cu energia cu care sînt șterse tegumentele în momentul recoltării. Ei critică, de asemenea, metoda amprentelor (amprenta directă a 4 degete pe o placă cu geloză nutritivă neselectivă), pe care o consideră numai calitativă, cu rol educativ. Autorii propun „metoda discului", care, deși prezintă unele dificultăți tehnice, are avantajele ușurinței în aplicare, a determinării cantitative și a reproductibilității. Ei utilizează un disc cartonat (Millipore) cu diametrul de 47 mm cu o cudură de 2—3 mm pe diametru. Persoana care recoltează poartă mănuși sterile. Recolta se efectuează prin ștergerea podului palmei printr-o mișcare identică la fiecare recoltă, prin 3 semirotații fără translația discului pe suprafața de recoltare. După recoltare, discul este introdus într-un tub cu 30 mm diametru. În laborator se pun în tub 15 ml apă peptonată 2‰. Dispersia se efectuează cu un omogenizator (Virtis, Mioblock, F 67022 Strassbourg), iar punerea în suspensie a germenilor cu un agitator rotativ (Vortex, Paris-Labo ; F 94300 Vincennes). Numărătorile se efectuează prin metoda diluțiilor pe geloză nutritivă, geloză nutritivă cu 20 mg/l acid nalidixic și geloză Sabouraud cu 200 ml/l cloramfenicol.

Pornind de la suprafața de pe care s-a recoltat, rezultatele se pot exprima în număr de germeni aerobi pe $dm^2$. Determinarea eficienței săpunului antiseptic este precedată de o recoltare înainte de utilizarea antisepticului.

Utilizînd această metodă, autorii constată :

— înainte de spălare, mîinile prezentau o contaminare foarte variabilă (de la cîteva sute la cîteva mii de germeni pe $dm^2$). Contaminarea mîinilor bărbaților era în general mai mare, ca cea a femeilor ;

— în comparație cu rezultatele înainte de spălare, folosind 6 săpunuri cu diferite antiseptice, observă, după spălare, scăderea numărului de germeni cu 68 pînă la 91% în blocurile sterile și 57 pînă la 95% la infirmiere ; produse care la personalul blocului operator au dat rezultate bune, la personalul infirmier au dat rezultate decepționante ; diferențele între cele două grupuri de personal testate se datoresc timpului de spălare diferit ;

— determinările calitative au arătat că, după spălare cu săpun, urmată de tratare cu alcool etilic, numărul probelor conținînd stafilococ coagulazo-pozitiv au fost foarte reduse și în nici una din probe nu s-a izolat Pseudomonas aeruginosa.

Pe baza acestei observații și a determinărilor cantitative, autorii ajung la concluzia că mijloacele moderne mai sofisticate (detergenții ca-

tionici, clorhexidina, povidoniodina etc.) nu depășesc prea mult rezultatele procedeului de spălare cu săpun obișnuit urmată de dezinfecție cu alcool etilic.

De regulă, în practică se utilizează antiseptice autorizate de autoritatea sanitară națională de control. Antisepticele se aplică numai după spălarea mîinilor și numai prin turnare, în cantitate suficientă pentru a umecta tegumentele ; timpul de contact este timpul scurs pînă la uscarea mîinilor. Mîinile nu se șterg după aplicarea de antiseptice. Soluțiile de antiseptice se prepară în cantități mici și se țin în flacoane etichetate cuprinzînd și data preparării. Nu se admite utilizarea dopurilor de plută pentru flacoanele cu soluții antiseptice.

Prezentăm în continuare, metoda recomandată prin norme și utilizată curent pentru controlul igienei mîinilor personalului sanitar, potrivit Ordinului Ministerului Sănătății nr. 190/1982.

Ca material de recoltare se întrebuințează tampoane de vată hidrofobă răsucită la capătul unei tije de lemn. Fiecare tampon se introduce pînă la fundul unei eprubete, capătul celălalt al tijei ieșind din eprubetă prin dopul de vată. Materialul astfel pregătit se sterilizează prin aer cald. Înainte de folosire, tamponul uscat este umezit cu 1 ml de apă peptonată 1‰ sau ser fiziologic peptonat 1‰ adăugat în eprubetă. Recoltarea probelor de pe mîini se efectuează astfel : cu tamponul umectat, așa cum a fost descris, se șterge suprafața palmară și dorsală a mîinii drepte și a degetelor, suprafața interdigitală și zonele periunghiale, trecînd tamponul de 2—3 ori peste fiecare zonă și rotindu-l neîncetat. Recoltarea probelor se efectuează la 10—15 minute după spălare și dezinfecția mîinilor, respectiv înainte de efectuarea unor tehnici de îngrijire a bolnavului.

Însămînțarea probelor se face în minimum de timp de la recoltare. În cazul cînd este necesar transportul de la un laborator în afara spitalului, probele se transportă la rece (termos cu gheață, ladă izotermă).

Se efectuează următoarele determinări :

— numărul total de germeni ;

— prezența de E coli, Proteus, stafilococ coagulazo-pozitiv.

În cazul anchetelor epidemiologice ale cazurilor de infecții intraspitalicești, se determină și alți germeni, în funcție de diagnosticul etiologic al cazului, respectiv focarului investigat.

Tehnicile de lucru uzuale sînt următoarele : în eprubeta fiecărui tampon se repartizează cîte 9 ml de ser fiziologic peptonat 1‰. Tamponul se lasă în repaus 10—15 minute, după care se agită puternic pentru eliberarea germenilor de pe vată și omogenizarea lor în lichidul de suspensie.

Pentru determinarea numărului total de germeni, din diluția brută se mai fac 2—3 diluții decimale, în apă peptonată 1‰. Atît din suspensia brută, cît și din fiecare diluție decimală se incorporează cîte 1 ml în geloză 2% cu pH 7,4—7,6 topită și răcită la 45—50°C, în plăci Pétri și se incubează 48 de ore la 37°C.

Pentru a afla numărul total de germeni pe mînă, se calculează media colonilor dezvoltate în fiecare placă, ținînd seama de factorul de diluție. Media astfel obținută se înmulțește cu 10, deoarece diluția brută este de 1/10.

Folosind tehnica de recoltare descrisă, se apreciază că mîna este curată dacă numărul germenilor nu depășește 200—300. Dacă recoltarea s-a făcut numai de pe fața palmară, așa cum este recomandată în normele menționate, numărul germenilor nu trebuie să fie peste 40 la 10—15 minute după dezinfecție. În cazul folosirii metodei pentru evaluarea în uz a unui antiseptic, se calculează procentul de reducere a numărului de germeni după folosirea antisepticului față de rezultatele dinainte de aplicarea antisepticului.

Prezența bacilului coli se urmărește prin însămînțarea a 1 ml din suspensia 1/10 în bulion lactozat cu tub de fermentație Durham, incubarea timp de 48 h la 37°C, subcultivarea pe mediul Levine, McConkey sau AABLT din probele care au produs fermentația zahărului cu eliberare de gaz. Pentru confirmare, coloniile lactozo-pozitive vor fi studiate biochimic.

Prezența bacilului Proteus se stabilește prin fenomenul de cățărare pe o geloză 1,5—2% înclinată la baza căreia s-a depus 1 ml din suspensia de germeni, cu incubare la 37°C timp de 24 ore.

Pentru depistarea stafilococului patogen se amestecă 2—3 ml din diluția brută, cu o cantitate egală de mediu de îmbogățire hiperclorurat lichid, iar după 24 ore de incubare la 37°C se face trecera pe geloză sînge 5—10% și mediul solid Chapmann. Coloniile manitopozitive și hemolitice se cercetează pentru prezența coagulazei.

Pe mîinile curate trebuie să fie absenți Es. coli, Proteus, Staphylococcus aureus și alți germeni patogeni.

Deoarece rezultatele determinărilor cantitative trebuie interpretate cu atenție așa cum s-a arătat, determinările calitative au o valoare mai larg acceptată de microbiologi. Metoda se utilizează curent pentru valoarea ei educativă.

## 6.5. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL PERSONALULUI SANITAR: EXAMENE PROFILACTICE ȘI EXAMENE DE FOCAR

Controlul microbiologic al exsudatelor nazale și faringiene și a altor produse biologice recoltate se efectuează după tehnicile descrise în volumul „Metode de laborator de uz curent" — publicat de Ministerul Sănătății — Academia de Științe Medicale, Editura Medicală, 1977.

Indicațiile de control medical la angajare și periodic, pentru personalul sanitar sînt cuprinse în Ordinul Ministerului Sănătății nr. 15 din 18.I.1982, publicat în Buletinul Ministerului Sănătății nr. 3 din 1982 și prevăd examenul clinic general trimestrial, examen radioscopic pulmonar anual și examen serologic pentru lues, anual, pentru toate categoriile de personal.

Pentru personalul elementar și personalul de îngrijire sînt obligatorii și examenele coprologice și coprobacteriologice în trimestrele 2 și 3 ale anului. Pentru personalul sanitar superior și mediu, examenul coprobacteriologic se efectuează anual. Se prevăd pentru depistarea stării de



Scanned with OKEN Scanner

purtător de Shigella, Salmonella și vibrion holeric și obligațiile de internare a purtătorilor depistați în secțiile de boli infecțioase pentru tratament și controlul bacteriologic prin 3 coproculturi efectuate în decurs de 3 zile începînd de la 48 de ore de la terminarea tratamentului. Purtătorilor depistați după prima serie de tratament li se aplică o a doua serie de tratament. Dacă starea de portaj continuă, este obligatorie schimbarea locului de muncă, respectiv utilizarea purtătorilor în locuri de muncă fără risc epidemiologic.

Personalul care lucrează în bucătării se supun examenului clinic semestrial, Rx pulmonar anual și examenului coprobacteriologic în trimestrele 2 și 3.

În același ordin este prevăzută obligația personalului muncitor să efectueze coproculturi ori de cîte ori prezintă tulburări acute digestive. Pentru sectorul alimentar (în care se includ și blocurile alimentare ale unităților sanitare cu paturi), se prevede triajul epidemiologic zilnic al personalului pentru depistarea persoanelor ce prezintă febră, diaree, vărsături, icter, amigdalită, furuncule, panariții, plăgi ale mîinilor, alte infecții ale pielii sau orice alte stări de boală.

Pe de altă parte, în Ordinul Ministerului Sănătății nr. 190/1982, publicat în Buletinul Ministerului Sănătății nr. 2 din anul 1982, se stabilesc următoarele obligații pentru personalul sanitar :

— autodeclararea la medicul șef de secție a oricărei boli infecțioase pe care o are sau de care suferă unui din membrii familiei ;

— triajul epidemiologic zilnic, la intrarea în serviciu, al personalului medico-sanitar, constînd din anamneză, observarea și examinarea medicală după caz pentru a depista la timp orice afecțiune diareică, respiratorie, cutanată și orice altă boală transmisibilă.

— izolarea în spitalul de boli contagioase sau trimitere la domiciliu, după caz, a oricărui suspect sau bolnav de boală transmisibilă ;

— interzicerea accesului în blocul operator, săli de naștere, secțiile de terapie intensivă, secțiile de pediatrie, obstetrică-ginecologie, unitățile de îngrijire arși, secțiile de nou-născuți, prematuri, distrofici, bloc alimentar, biberonerii, bucătării de lapte, a personalului medico-sanitar care prezintă infecții ale căilor respiratorii, tulburări acute digestive (vărsături, diaree), afecțiuni septice cutanate (abcese, plăgi infectate oricît de mici, alte leziuni infectate ale pielii), infecții ale conjuctivitelor, nasului și urechilor.

Este necesar ca în toate aceste cazuri de infecții depistate la personalul sanitar să se efectueze examene microbiologice pentru diagnostic etiologic. Examenele efectuate la personalul care prezintă semne de boală, prezintă o mare valoare epidemiologică pe lîngă utilitatea tratamentului etiologic al fiecărui caz. Probele care se recoltează și examenele microbiologice ce se efectuează depind de diagnosticul clinic. Importantă este legătura între secții și compartimente cu laboratorul, pentru a organiza efectuarea acestor examene în condiții optime de recoltare și obținere la timp a rezultatelor.

Personalul sanitar este supus de asemenea, examenului microbiologic în cadrul anchetelor epidemiologice de infecții intraspitalicești pentru depistarea stării de purtători sau a unor forme subclinice de boală. Investigația microbiologică este orientată de diagnosticul focarului epidemic. Ast-



Scanned with OKEN Scanner

fel, de exemplu, în focarele de infecții stafilococice se determină starea de portaj de stafilococ în exsudatele nazale și faringiene, iar în unele cazuri în zona perineală. Se efectuează antibiograma și lizotipia, stabilindu-se purtătorii de tulpini identice cu cele izolate de la bolnavi, criterii pentru a adopta măsurile terapeutice față de purtătorii de stafilococ depistați. Un alt exemplu este investigarea stării de portaj de Es. coli enteropatogen, Es. coli enteroinvaziv sau Campylobacter în diareele la nou-născuți și sugari, apărute în spital, pe lîngă investigațiile uzuale pentru Salmonella și Shigella sau depistarea formelor de hepatită anicterică și purtătorilor de antigen $HB_s$ în focarele de hepatită virală apărute în secții de pediatrie sau distrofici.

Medicul de laborator aduce un aport esențial în efectuarea anchetelor epidemiologice prin stabilirea diagnosticului etiologic al bolnavilor, dar și prin examinarea cu promptitudine a personalului sanitar contact printre care se pot depista surse de infecție.

## 6.6. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL UMIDIFICATOARELOR ȘI TUBULATURII PENTRU ADMINISTRAREA OXIGENULUI. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL RESPIRATOARELOR

În mod uzual este recomandabil ca recipientul de sticlă al umidificatorului de oxigen să se sterilizeze zilnic. Apa pentru umidificare trebuie să fie sterilă și să se schimbe zilnic. Tubulatura de cauciuc, de asemenea, se sterilizează zilnic la autoclav la 120°C timp de 20—30 de minute. Aceste condiții se impun și la începutul administrării de oxigen pentru fiecare pacient. În timpul cît nu se utilizează, flacoanele se demontează astfel încît tubul metalic și capul acestuia (prin care se introduce oxigenul în umidificator) să rămînă uscate, după dezinfecția cu alcool etilic, iar pentru a fi ferit de praf se poate acoperi cu un săculeț de plastic. Aplicarea acestor măsuri permit reducerea posibilităților de contaminare și multiplicare a unor bacterii, cum ar fi Pseudomonas, Actinobacter sau E. coli, Enterobacter.

În prezent, nu dispunem de norme pentru controlul microbiologic privind limitele admise asupra încărcăturii microbiene a apei din umidificatoarele de oxigen și tubulaturii de cauciuc pentru administrarea oxigenului.

Într-o lucrare efectuată de noi, am folosit metodele de control pe care le prezentăm în continuare.

Din recipientul umidificatorului s-au recoltat în condiții aseptice 10 ml de apă ; cu aceeași cantitate de apă sterilă s-a spălat interiorul tubului de cauciuc de la capătul distal, pe o lungime de 50 cm delimitat cu o clemă. Capătul distal al tubului de cauciuc s-a dezinfectat prin ștergere cu alcool etilic înainte de recoltare. În timpul recoltării, oxigenul pentru asistat era asigurat printr-un umidificator de la patul alăturat.

Probele au fost transportate în laborator unde s-au efectuat determinări cantitative și calitative.



Scanned with OKEN Scanner

Numărul de germeni pe ml s-a determinat prin incorporarea a 1 ml de apă în geloză simplă 2% topită și răcită la 45—50°C ; incubare la 37°C și numărarea coloniilor.

Calitativ s-a urmărit prezența de bacterii coliforme și E. coli prin însămînțare în BBLV și BL cu tub de fermentație Durham. În cazul fermentării lactozei cu prezența de gaz în tubul Durham pe cel puțin 1/10 din înălțimea lui, s-au efectuat subcultivarea pe mediul Levine, AABTL sau McConkey și identificarea pe baza testelor biochimice.

Prezența Pseudomonas aeroginosa s-a efectuat prin îmbogățirea unei cantități din proba de apă în bulion + 0,3‰ bromocet, confirmare pe cetrimid agar și stabilirea caracterelor biochimice. Tulpinile au fost confirmate de Institutul „Dr. Cantacuzino".

Au fost obținute rezultatele ce sînt redate în tabelul nr. XLVIII, XLIX, L.

*Tabel nr. XLVIII*

**Număr germeni pe ml. în probele de apă din umidificatoare înainte și după aplicarea măsurilor de igienă**

| *Grupa de probă după nr. germeni pe ml. apă* | *Proba de apă din umidificator* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Înainte de aplicarea măsurilor de igienă (A)* | | *După aplicarea măsurilor de igienă (B)* | |
| | *Nr.* | *%* | *Nr.* | *%* |
| 0—1 | 41 | 38 3 | 44 | 77,3 |
| 2—100 | 35 | 32,7 | 8 | 13,9 |
| 100 | 31 | 29,0 | 5 | 8,8 |
| | 107 | 100,0 | 57 | 100,0 |

*Tabel nr. XLIX*

**Număr germeni pe ml. în probele de apă de spălare a tuburilor de cauciuc pentru oxigen înainte și după aplicarea măsurilor de igienă**

| *Grupa de probă după Nr. germeni pe ml.* | *Proba de apă spălare a tuburilor de cauciuc* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Înainte de aplicarea măsurilor (A)* | | *După aplicarea măsurilor (B)* | |
| | *Nr.* | *%* | *Nr.* | *%* |
| 0—1 | 43 | 40,2 | 53 | 93,0 |
| 2—100 | 44 | 41,1 | 4 | 7,0 |
| 100 | 20 | 18,7 | 0 | 0 |
| | 107 | 100,0 | 57 | 100,0 |



Scanned with OKEN Scanner

*Tabel nr. L*

**Tulpini de bacterii identificate în probele de apă din umidificatoare și în probele de apă de spălare a tuburilor de cauciuc pentru oxigen**

| *Denumirea tulpinilor* | *Număr de tulpini* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Apă umidificator în condiții :* | | *Apă de spălare a tubulaturii de cauciuc în condiții :* | |
| | *A* | *B* | *A* | *B* |
| E. coli | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Enterobacter | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P. aeruginosa | 3 | 0 | 3 | 0 |
| Pseudomonas spp. | 30 | 0 | 18 | 0 |
| Acineto-bacter spp. | 6 | 0 | 4 | 0 |

Determinările de colonizare nazală a nou-născuților asistați în incubatoarele, în care se distribuia oxigen din umidificatorale și tubulatura investigate, au arătat reducerea semnificatviă a colonizării nazale cu bacili gram negativi aerobi, după introducerea măsurilor de igienă. Aceste date pot constitui o bază pentru a stabili norme de igienă și de control microbiologic privind umidificatoarele și tubulatura de cauciuc pentru oxigen.

În ceea ce privește controlul bacteriologic al respiratoarelor, datele din literatură arată contaminarea rapidă a acestora în timpul utilizării. S-au descris infecții respiratorii care se corelează cu contaminarea respiratoarelor. În mod practic este necesar ca respiratoarele să fie dezinfectate înainte de folosirea la un nou pacient.

Dintre metodele utilizate se pare că cea mai eficace este dezinfecția cu vapori de formol în condiții corespunzătoare de temperatură, umiditate și timp de expunere. Controlul bacteriologic va urmări în acest caz eficiența metodei de dezinfecție cu formol. În cadrul unor anchete epidemiologice se recomandă recoltarea de probe din umidificator, aplicîndu-se tehnicile de control bacteriologic recomandate pentru umidificatoarele de oxigen.

Controlul microbiologic al aeromicroflorei și suprafețelor alimentelor și apei se efectuează după tehnicile expuse la capitolele respective. Mediile de cultură recomandate în acest capitol sînt mediile livrate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino“ sau preparate după Framacopeea Română, ediția a IX-a, 1976.

## Bibliografie


1. BLOCK S. SEYMOUR — Disinfection, Sterilisation and Preservation, ed. a 3-a, Lea and Febbliger, Philadelphia, 1983.
2. CAZACU E., BRĂILEANU MARIA, GRIPCĂ VIORICA — Determinarea potențialului epidemiologic al serviciilor de terapie intensivă pentru nou-născuți, Institutul de Igienă și Sănătate Publică București, Sesiunea științifică, 1985.
3. DARBORD J. C., BRION F., BERNARD M. — Nouv. Presse Méd. 1978, 7, 11.




Scanned with OKEN Scanner

# 7. Medi de cultură

1. *Agar de acoperire* (Clostridii sulfito-reducătoare)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| sulfit de Na ($Na_2SO_3$) sau | 1,3—2,6 g |
| tioglicolat de sodiu $HS \cdot CH_2 \cdot CO \cdot Na$ | 1 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă peptona în apă distilată, se ajustează pH-ul la 7,2—7,4 și se distribuie soluția de peptonă și agarul în flacoane în volume corespunzătoare utilizării ulterioare :

| | agar | soluție peptonă |
|---|---|---|
| — pentru plăci Pétri cu ∅ = 50—60 mm | 2,3 g | 150 ml |
| — pentru plăci Pétri cu ∅ = 90—95 mm | 4,6 g | 300 ml |

Se sterilizează la autoclav la 120°C timp de 20 minute și se stochează agarul de bază. Înaintea utilizării se prepară soluția de sulfit de sodiu (1,3 g în 100 ml apă distilată) sau soluția de tioglicolat de sodiu (5 g în 50 ml apă distilată). Cele două soluții nu este necesar să fie sterilizate sau dacă se dorește sterilizarea aceasta se va face prin filtrare.

Prepararea agarului de acoperire pentru tehnica membranei filtrante și tehnica încorporării în placă :

| Componente | Volum în $cm^3$ necesar pentru plăci Pétri cu ∅ de 50—60 mm | 90—95 mm |
|---|---|---|
| agar de acoperire pentru un strat de 5—6 mm | 15 | 30 |
| agar de bază de acoperire | 150 | 300 |
| soluția tioglicolat de sodiu | 1,5 | 3 |
| sau | | |
| soluție sulfit de Na | 3 | 6 |
| acid sulfuric | 3 | 6 |

2. *Agar-albastru de bromtimol-lactoză* (AABTL) — mediu diferențial pentru enterobacteriaceae lactoză pozitive sau negative

| | |
|---|---|
| peptonă din carne | 3,5 g |
| peptonă din caseină | 3,5 g |
| clorură de sodiu | 5,0 g |
| lactoză | 15,5 g |
| albastru de bromtimol | 0,04 g |

| | |
|---|---|
| agar-agar pulvis | 13,0 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,0± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 min la 121°C.

Acest mediu este preparat în mai multe variante. Pentru ridicarea calității nutritive, unii producători adaugă L-cistină (0,128 g/l) și scot electrolitul (grupul Proteus nu roiește).

3. *Agar-cărbune — extract de drojdie* (Mediul I izolare Legionella pneumophilla)

| | |
|---|---|
| agar | 17 g |
| extract de drojdie | 10 g |
| cărbune activat | 2 g |

Se dizolvă în 980 ml apă distilată prin fierbere și se autoclavează la 121°C timp de 15 min. Se răcește la 50°C în baie de apă cînd se adaugă soluții proaspete sterilizate prin filtrare de L-cysteină $HCl \cdot 2H_2O$ (0,4 g în 10 ml apă distilată) și apoi pirofosfat feric solubil (culoare verde) (0,25 g în 10 ml apă distilată). Se ajustează pH-ul la 6,9 la temperatura de 50°C cu soluție de 1 N de KOH, după care se toarnă în plăci.

4. *Agar — caseină — amidon* (Mediu II izolare Legionella pneumophilla)

| | |
|---|---|
| caseină (hidrolizat acid) | 17,5 g |
| extract de carne | 3 g |
| amidon | 1,5 g |
| agar | 17 g |

Se dizolvă în 980 ml apă distilată prin fierbere, se autoclavează la 121°C timp de 15 min, se răcește la 50°C într-o baie de apă și se adaugă aceleași soluții ca la mediul agar-cărbune-extract de drojdie. Se ajustează pH-ul la 6,9 cu soluția 1 N de KOH și se toarnă în plăci.

5. *Agar citrat-azidă de sodiu-bilă-esculină (streptococi fecali)*

| | |
|---|---|
| triptonă | 17 g |
| peptonă | 3 g |
| extract de drojdie | 5 g |
| săruri biliare | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| citrat de sodiu | 1 g |
| esculină | 1 g |
| citrat de fier amoniacal | 0,50 g |
| azidă de sodiu | 0,25 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă componentele la fierbere. Se repartizează cîte 13—15 $cm^3$ în eprubete și se sterilizează la 121°C timp de 15 min. Valoarea pH-ului trebuie să fie de 7,0—7,2 după sterilizare. Mediul trebuie ținut la 4—5°C pentru maximum 4 ore înainte de repartizarea lui în plăci.

6. *Agar, dezoxicolat-citrat-lactoză (ADCL)* (Salmonella, Shigella)

Geloza nutritivă de bază :

| | |
|---|---|
| agar | 20 g |
| extract de carne | 5 g |
| peptonă | 5 g |
| lactoză | 10 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă ingredientele la fierbere, se ajustează pH-ul la 7,4 se adaugă 1,3 $cm^3$ roșu neutru sol 2%, se sterilizează 20 min la 115°C și se stochează la rece. În momentul folosirii se topește geloza de bază și se adaugă : pentru 100 $cm^3$ geloză nutritivă de bază 5 $cm^3$ soluție A și 2,5 $cm^3$ soluție B ; se omogenizează și se toarnă în plăci Pétri.

*Soluția A :*

| | |
|---|---|
| citrat de sodiu ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) | 17 g |
| tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) | 17 g |
| citrat de fier | 2 g |
| apă distilată | 100 $cm^3$ |

Se sterilizează timp de o oră la 60°C. Se păstrează la temperatura camerei.

*Soluția B :*

| | |
|---|---|
| dezoxicolat de sodiu | 10 g |
| apă distilată | 100 $cm^3$ |

Se sterilizează timp de o oră la 60°C. Se păstrează la temperatura camerei.

7. *Agar-dezoxicolat-citrat-manitol* (pentru Yersinia enterocolitica)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 3 g |
| citrat de sodiu | 16 g |
| citrat feric amoniacal | 2 g |
| tiosulfat de sodiu (anhidru) | 2 g |
| fosfat bibazic de potasiu ($K_2HPO_4$) | 2 g |
| manitol | 8 g |
| peptonă | 4 g |
| triptonă | 4 g |
| dezoxicolat de sodiu | 1 g |
| arag | 15 g |
| roșu neutru | 0,33 g |

Se dizolvă ingredientele la cald, dar mediul nu se autoclavează ; se răcește la 55°C și se toarnă în plăci.

8. *Agar glucoză — azidă de sodiu — TTC* (Slanetz-Bartley) streptococi fecali

| | |
|---|---|
| triptoză | 20 g |
| extract de drojdie | 5 g |
| glucoză | 2 g |
| hidrogenofosfat dipotasic ($K_2HPO_4$) | 4 g |
| azidă de sodiu | 0,40 g |
| agar | 10 g |
| 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) | 0,10 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă componentele, cu excepția TTC. La fierbere se ajustează pH-ul la 7,2. Înainte de folosire, se adaugă soluția apoasă 1% de TTC sterilizată prin filtrare în proporție de 2 $cm^3$ pentru 200 $cm^3$ mediu.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru tehnica membranei filtrante, mediul se toarnă direct în plăci Pétri și se păstrează la rece (+4—10°C) și la adăpost de lumină pentru maximum 15 zile.

Pentru tehnica încorporării în placă, se repartizează volume de 200 $cm^3$ mediu în flacoane sterile, fără să se adauge soluția de TTC. Flacoanele trebuie ținute la 43—45°C pentru o perioadă de maximum 4 ore înainte de repartizarea mediului în plăci. Se adaugă soluția TTC înainte de folosire. Nu se retopește mediul solidificat.

9. *Agar-glucoză-cartof* (drojdii și mucegaiuri)

| | |
|---|---|
| infuzie din 200 g cartof | 1 000 ml |
| glucoză | 20 g |
| agar | 15 g |

Se fierb timp de o oră, 200 g cartofi tăiați felii, în 1 000 ml apă. Amestecul se filtrează prin două straturi de pînză, prin stoarcere. La filtrat se adaugă apă pînă la volumul inițial (1 000 ml) și agarul spălat. Soluția obținută se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 10 min și se filtrează prin vată, la cald. Se adaugă glucoza și după dizolvarea acesteia se repartizează cîte 100 ml în flacoane de sticlă și se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 15 min. În momentul folosirii, mediul se topește în baia de apă, se răcește la temperatura de 47± 1°C și se adaugă în mod steril cîte 0,8 ml soluție sterilă de acid tartric 10% încălzită la 47°C ; pH-ul final al mediului trebuie să fie 3,5.

10. *Agar-Leifson* (1935) modificat de Heynes (1942) (Salmonella, Shigella)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 5,0 g |
| peptonă din carne | 5,0 g |
| lactoză | 10,0 g |
| tiosulfat de sodiu | 5,4 g |
| citrat de fier (III) amoniacal | 1,0 g |
| citrat de sodiu | 6,0 g |
| desoxicolat de sodiu | 3,0 g |
| roșu neutru | 0,02 g |
| agar-agar pulvis | 12,0 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |
| pH 7,5± 0,1 | |

Mediul se prepară separat sub formă de geloză nutritivă și se sterilizează 15 min la 121°C ; înainte de a turna mediul în plăci Pétri, la geloza nutritivă topită și răcită la 50°C se adaugă celelalte ingrediente ; se amestecă bine și se toarnă în plăci Pétri.

Salmonella crește bine ; Shigella uneori este inhibată (ex. Shigella shiga).

11. *Agar lizină-arginină* (Yersinia enterocolitica)

| | |
|---|---|
| peptonă | 5 g |
| extract de drojdie | 3 g |
| glucoză | 1 g |
| L-lizină | 10 g |
| L-arginină | 10 g |
| citrat feric amoniacal | 0,5 g |
| tiosulfat de sodiu | 0,04 g |
| bromcrezol purpur | 0,02 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| agar | 15 g |
| pH = 6,8 | |

12. *Agar-malț* (drojdii și muceagiuri)

| | |
|---|---|
| făină de malț | 250 g |
| agar | 30 g |
| apă | 1 000 ml |

La 250 g făină de malț se adaugă 1 000 ml apă. Amestecul se încălzește la 57°C și se menține la această temperatură timp de o oră, pînă în momentul în care reacția amidon-iod (culoarea albastră) este negativă. Se ridică temperatura la 110°C, se filtrează prin pînză, storcîndu-se partea nesolubilizată și se aduce la 1 000 ml cu apă. În lichidul astfel obținut se adaugă 30 g agar și se menține timp de 10 min la temperatura de 120°C. Se filtrează la cald prin vată, se repartizează cîte 100 ml în flacoane de sticlă și se sterilizează la temperatura de 115°C timp de 15 min. În momentul folosirii, mediul se topește într-o baie de apă, se răcește la temperatura de 47 ± 1°C și se adaugă în mod steril, cîte 0,8 ml soluție sterilă de acid lactic 5% ; pH-ul final al mediului trebuie să fie 3,5. Mediul astfel obținut trebuie să fie folosit în maximum o oră de la preparare. Cantitatea rămasă nu se mai folosește.

13. *Agar — manită — gălbenuș de ou — polimixină* (MYP — după Mossel) (Bacillus cereus)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 1 g |
| petonă | 10 g |
| D-manită | 10 g |
| clorură de sodiu | 10 g |
| roșu fenol | 0,025 g |
| agar-agar, pulbere | 15 g |
| apă | 900 ml |
| emulsie de gălbenuș de ou | |
| soluție 20% | 10 ml |
| sulfat de polimixină B. | |
| soluție 1‰ | 1 ml |

Se dizolvă ingredientele în 900 ml apă cu excepția roșului de fenol, emulsiei de gălbenuș de ou și a sulfatului de polimixină. Se ajustează pH-ul la 7,1 ± 0,5 se adaugă roșu de fenol, se repartizează cîte 200 ml în vase Erlenmeyer și se sterilizează la 121°C timp de 15 min. În momentul folosirii se topește mediul preparat ca mai sus, se răcește la 47°C și se adaugă emulsia de gălbenuș de ou (10 ml) și soluția de sulfat de polimixină B (1 ml). Se omogenizează și se toarnă în cutii Pétri.

14. *Agar — manitol — roșu fenol* (Salmonella)

| | |
|---|---|
| extract de carne de vacă | 1 g |
| proteoză peptonă nr. 3 | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| agar | 15 g |
| roșu fenol | 0,025 g |
| manitol | 10 g |
| apă distilată | 1 000 ml |
| pH-ul este ajustat la 7,4 | |

Se autoclavează la 121°C dar nu mai mult de 10 minute.



Scanned with OKEN Scanner

15. *Agar peptonă triptică — dextroză — purpur de bromcrezol*

| | |
|---|---|
| peptonă triptică | 10 g |
| dextroză | 5 g |
| purpur de bromcrezol | 0,04 g |
| agar fibre | 15 g |
| apă | 1 000 ml |
| pH 7,0± 0,2 | |

Se dizolvă ingredientele prin fierbere, se repartizează în vase Erlenmayer de 200 ml și se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

16. *Agar — săruri biliare* ($B_1$) (mediu slab inhibant pentru Vibrio cholerae)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| extract de carne | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| taurocholat de sodiu | 5 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml |
| pH-ul este ajustat la 8,6± 0,1 | |

17. *Agar — sînge*

| | |
|---|---|
| agar nutritiv, cu pH 7,1± 0,1 | 90—93 ml |
| sînge de ovine defibrinat | 7—10 ml |

La agarul nutritiv topit și răcit la 47°C se adaugă 7—10% sînge de ovine defibrinat, recoltat aseptic și păstrat la 4°C, timp de maximum 14 zile.

18. *Agar — sulfit de sodiu*

| | |
|---|---|
| triptonă | 10 g |
| sulfit de sodiu | 0,5 g |
| citrat feric (mojarat) | 0,5 g |
| agar fibre | 15 g |
| apă | 1 000 ml |
| pH 7,2± 0,2 | |

Se dizolvă ingredientele prin fierbere. Se repartizează în vase Erlenmayer de 200 ml, se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

19. *Agar — taurocholat — gelatină* ($B_2$) (Vibrio cholerae)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| extract de drojdie | 1 g |
| taurocholat de sodiu | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| gelatină | 30 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml |
| pH-ul este ajustat la 8,0 | |

Se sterilizează la 121°C timp de 15 minute.

20. *Agar — taurocholat — telurit — gelatină* ($B_4$) (mediu inhibant pentru Vibrio cholerae)

| | |
|---|---|
| trypticază | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| cholat de sodiu | 5 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| $Na_2CO_3$ | 1 g |
| gelatină | 30 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH-ul este ajustat la 8,5 ± 0,1

Se sterilizează la autoclav la 121°C pentru 15 minute. Înaintea turnării la plăci se adaugă mediului 1 ml soluție 1% de telurit de potasiu sterilizată prin filtrare.

21. *Agar — tiosulfat — citrat — bilă — sucroză* ($B_3$) (pentru Vibrio cholerae)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| extract de drojdie | 5 g |
| citrat de sodiu | 10 g |
| tiosulfat de sodiu | 10 g |
| bilă de bou (uscată) | 5 g |
| cholat de sodiu | 3 g |
| sucroză | 20 g |
| NaCl | 10 g |
| citrat feric | 1 g |
| albastru de bromtimol | 0,04 g |
| agar | 14 g |
| albastru de timol | 0,04 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH-ul este ajustat la 8,6 ± 0,1.

Se sterilizează prin fierbere, dar se evită autoclavarea.

22. *Agar — triptonă cu sulfit de sodiu, polimixină B și neomicină* (mediu selectiv pentru Clostridium perfringens, după Marshall)

| | |
|---|---|
| triptonă sau tripticar pulvis | 15 g |
| extract de drojdie | 10 g |
| sulfit de sodiu | 1 g |
| citrat de fier | 0,5 g |
| sulfat de polimixină B | 0,02 g |
| sulfat de neomicină | 0,05 g |
| agar-agar | 15 g |
| apă | 1 000 ml |

Toate componentele se introduc într-un vas de 2—3 l și se fierb pînă la dizolvarea completă. Se ajustează pH-ul, în așa fel încît să se obțină un pH final de 7,0—7,4. Mediul încă fluid se filtrează prin vată și se repartizează cîte 15—16 ml în eprubete de 16×160 mm, în așa fel ca mediul să ocupe 3/4 din înălțimea eprubetelor. Se sterilizează 30 min la 121°C.

23. *Apă peptonată alcalină* (pentru îmbogățire și vibrioni holerici)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH-ul este ajustat la 8,6 ± 0,1

24. *Apă peptonată pentru reacția indolului* (coliformi, Escherichia col)

| | |
|---|---|
| peptonă, care conține | 20 g |
| triptofan | 5 g |
| clorură de sodiu | 1 000 ml |
| apă distilată | |

25. *Apă peptonată — telurit — taurocholat* (pentru îmbogățire, vibrioni holerici)

| | |
|---|---|
| trypticază | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| taurocholat de sodiu | 5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |
| pH-ul este ajustat la 9,2± 0,1 | |

Se sterilizează mediul la 121°C la 15 minute. Înaintea utilizării se adaugă în apă 1 ml telurit de potasiu 1% sterilizat prin fierbere.

26. *Apă peptonată tamponată*

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| fosfat disodic | 9 g |
| ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | |
| fosfat monopotasic | 1,5 g |
| ($KH_2PO_4$) | |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Componentele se dizolvă în apă la fierbere. Se ajustează pH-ul la 7,0± 0,1 la 20°C, se repartizează și se sterilizează la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

27. *Apă peptonală 1%* (Candida)

— 10 g peptonă în 1 000 ml apă distilată.

Se repartizează cantitatea totală (de cît este nevoie pentru tulpinile ce urmează a fi testate) în baloane, cîte 200 ml pentru fiecare balon. Se sterilizează în autoclav. După sterilizare se repartizează 4 g din fiecare zahar. Mediul acesta zaharat se repartizează în eprubete mici sterile, cca 4—5 cm cu o pipetă sterilă. Tampoanele de parafină se fac din două părți parafină solidă și o parte ulei de parafină, apoi se sterilizează la autoclav la 120°C.

28. *Apă peptonată 1%+1% TTC* (Pseudomonas aeruginosa)

| | |
|---|---|
| soluția TTC 10% | 10 g |
| TTC (trifeniltetrazolium chlorid) | |
| apă distilată | 1 000 ml |

Sterilizare prin filtrare, prin filtre Seitz $EtS_1$.

Soluția se păstrează în flacon brun, steril, la frigider.

La 90 ml apă peptonată 1%, sterilă, se adaugă în mod steril 10 ml soluție TTC 10% pentru a se realiza o concentrație finală de 1% TTC. Acest mediu se va controla pentru sterilitate, prin însămînțare pe geloză înclinată 2% cu incubare timp de 24 h la 37°C. Mediul se repartizează în volum de 5 ml, aseptic.

29. *Bulion — acetamidă* (Pseudomonas aeruginosa)

| | |
|---|---|
| acetamidă (Amida $C_2$) | 2 g |
| ($C_2H_5NO$) | |
| sulfat de magneziu ($SO_4Mg$) | 0,158 g |
| clorură de sodiu | 0,2 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| natrium molibdat | 0,005 g |
| sulfat feros ($FeSO_4$) | 0,0005 g |
| fosfat hidrogen dipotasic ($PO_4HK_2$) | 0,2 g |
| apă distilată | 1 000 g |

Se ajustează pH-ul la 7± 0,1. Se autoclavează la 120°C timp de 10 minute.

30. *Bulion azidă de sodiu simplu și dublu concentrat* (pentru îmbogățire streptococi fecali)

| | simplu | dublu conc. |
|---|---|---|
| extract de carne | 4,5 g | 9 g |
| proteoze-peptonă | 15 g | 30 g |
| glucoză | 7,5 g | 15 g |
| clorură de sodiu | 7,5 g | 15 g |
| azidă de sodiu | 0,2 g | 0,4 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ | 1 000 $cm^3$ |

Componentele se dizolvă în apă, se ajustează pH-ul la 7,2—7,4. Se repartizează și se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

31. *Bulion de azidă de sodiu — bromcresol purpur* (pentru confirmare streptococi fecali)

| | |
|---|---|
| proteoze-peptonă | 20 g |
| glucoza | 5 g |
| clorura de sodiu | 5 g |
| hidrogeno-fosfat bipotasic ($K_2HPO_4$) | 2,7 g |
| dihidrogenofosfat de potasiu ($KH_2PO_4$) | 2,7 g |
| azidă de sodiu | 0,4 g |
| bromcresol purpur sol. 1,6% în alcol etilic 98% vol. | 2 $cm^3$ |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă componentele, cu excepția bromcresol purpurului și se corectează pH-ul de 7,2—7,3. Se adaugă bromcresolul purpur, se repartizează cîte 2—3 $cm^3$ în eprubete și se sterilizează la 115°C timp de 30 minute.

32. *Bulion — azolecitina — Tween 20* (mediu recomandat pentru produsele cosmetice)

| | |
|---|---|
| peptonă triptică din cazeină sau altă peptonă de bună calitate | 20 g |
| azolecitină | 5,0 g |
| Tween 20 | 40 ml |
| apă distilată | 1 000 ml |

Lecitina se dizolvă în 500 ml apă distilată rece după care se adaugă peptonă Tween 20 și completare la litru cu apă bidistilată ; totul se încălzește la baia de apă 30 minute la 50°C ; se amestecă bine și se fixează pH-ul la 7,5±0,1. Se repartizează cîte 40 ml în flacoane și se sterilizează 20 minute la 121°C.

33. *Bulion bilă — lactoză — verde briliant (BBLV)* (coliformi, Escherichia coli)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| bilă de bou uscată | 20 g |
| lactoză | 10 g |

| | |
|---|---|
| verde briliant sol. apoasă 0,1% | 13 $cm^3$ |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă componentele, se ajustează pH-ul la 7,2±0,1 se adaugă colorantul, se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

34. *Bulion Blaser* (pentru îmbogățire Campylobacter) bulion tioglicolic cu 0,16% agar, la care se adaugă

| | |
|---|---|
| vancomicină | 10 µg/ml |
| trimetoprim | 5 µg/ml |
| polimixină B | 2,5 U.I./ml |
| amfotericin B | 2 µg/ml |
| cefalotin | 15 µg/ml |

35. *Bulion pentru clostridii sulfito-reducătoare simplu și dublu concentrat*

| | simplu | dublu conc. |
|---|---|---|
| peptonă | 10 g | 20 g |
| extract de carne | 10 g | 20 g |
| extract de drojdie | 1,5 g | 3 g |
| acetat de sodiu (hidratat) | 5 g | 10 g |
| amidon solubil | 1 g | 2 g |
| glucoză | 1 g | 2 g |
| L(-) cisteină | 0,5 g | 1 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ | 1 000 $cm^3$ |
| resazurină sau | 0,002 g | 0,004 g |
| albastru de metilen | | |

Se dizolvă la fierbere peptona, extractul de carne, extractul de drojdie, acetatul de sodiu în 800 $cm^3$ apă distilată. Se adaugă amidonul în apă rece și apoi se completează la 200 $cm^3$ cu apă, agitîndu-se pînă se obține o pastă. Se adaugă această pastă la cei 800 $cm^3$ amestec și se fierb pentru a dizolva toate ingredientele, apoi se adaugă glucoza și cisteina. Se aduce pH-ul la 7,1±0,1. Se sterilizează la autoclav la 115°C timp de 20 minute. Înainte de utilizare se adaugă pentru fiecare 100 $cm^3$ mediu de bază cîte 1 $cm^3$ din soluția 4% de sulfit de sodiu și 7% de citrat feric sterilizate prin filtrare și se repartizează steril.

36. *Bulion glucoză — azidă de sodiu — ethyl violet*

| | |
|---|---|
| triptonă | 20 g |
| glucoză | 5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| hidrogenofosfat bipotasic ($K_2HPO_4$) | 2,7 g |
| dihidrogenofosfat de potasiu ($KH_2PO_4$) | 2,7 g |
| azidă de sodiu | 0,40 g |
| ethyl violet | 0,80 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă componentele în apă distilată și se corectează pH-ul la 7,0±0,1. Se repartizează în eprubete cîte 10 $cm^3$ și se sterilizează la 114°C timp de 10 minute.

37. *Bulion glucoză — fosfat pentru reacțiile R—M și V.P.* (reacții biochimice pentru Enterobacteriaceae)

| | |
|---|---|
| peptonă | 5 g |
| hidrogen fosfat bipotasic | 5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| glucoză sol. 10% sterilă | 50 g |
| soluție roșu metil pentru reacția R—M | |
| roșu metil | 0,04 g |
| alcool etilic | 60 $cm^3$ |
| reactivul O'Meara pentru reacția V—P | |
| hidroxid de potasiu | 40 g |
| apă distilată | 100 $cm^3$ |
| creatină | 0,3 g |

38. *Bulion glucozat cu ficat sau carne fiartă* (anaerobi sulfito-reducători)

| | |
|---|---|
| extract de carne lichid | 1 000 ml |
| peptonă | 10 g |
| clorură sodiu | 5 g |
| extract de drojdii | 5 g |
| glucoză | 10 g |

Ficat proaspăt de bovine sau carne fiartă și uscată.

Se dizolvă toate componentele la fierbere, se ajustează pH-ul la 7,4± 0,1 și se filtrează prin vată. Ficatul proaspăt de bovine se fierbe, se taie în bucăți (2—3/1—1,5 cm). Se introduce cîte o bucată de ficat fiert în cîte o eprubetă și se toarnă 10—12 ml bulion glucozat. În locul bucăților de ficat se poate folosi și carne fiartă, tocată, uscată. În acest caz, coloana de carne trebuie să aibă înălțimea de aproximativ 1 cm. Eprubetele cu mediu se sterilizează 15 minute la 115°C.

39. *Bulion GN (Hanja)* (pentru îmbogățire Shigella)

| | |
|---|---|
| peptonă | 20 g |
| dextroză | 1 g |
| D-manitol | 2 g |
| citrat de sodiu | 5 g |
| dezoxicolat de sodiu | 0,5 g |
| fosfat bipotasic ($K_2HPO_4$) | 4 g |
| fosfat monopotasic ($KH_2PO_4$) | 1,5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |

Toate ingredientele se dizolvă la cald, se ajustează pH-ul la 7± 0,2 și se stabilizează la 115°C timp de 20 minute.

40. *Bulion Hottinger*

| | |
|---|---|
| apă de robinet | 4 500 $cm^3$ |
| concentrat Hottinger | 500 $cm^3$ |
| fosfat disodic | 5 g |
| clorură de potasiu | 1 g |
| clorură de sodiu | 15 g |
| hidrat de Na sol. 1% | 40—60 $cm^3$ |

pH 7,4—7,6. Sterilizarea la 120°C timp de 130 minute.

41. *Bulion — lactozat*

| | |
|---|---|
| extract de carne | 3 g |
| peptonă din gelatină | 5 g |
| sau din caseină | (10) g |
| lactoză | 5 g |
| pH 6,9±0,1 | |

Sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C ; după sterilizare mediul se răcește în cel mai scurt timp.

42. *Bulion lauryl sulfat simplu și dublu concentrat* (îmbogățire coliform)

| | | |
|---|---|---|
| peptonă triptică | 20 g | 40 g |
| hidrogen fosfat disodic ($Na_2HPO_4$) | 2,75 g | 5,5 g |
| dihidrogenfosfat de sodiu ($NaH_2PO_4$) | 2,75 g | 5,5 g |
| clorură de sodiu | 5 g | 10 g |
| lactoză | 5 g | 10 g |
| lauryl sulfat de sodiu | 0,1 g | 0,2 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ | 1 000 $cm^3$ |

Componentele se dizolvă în apă, se ajustează pH-ul la 6,8±0,1, se repartizează în flacoane și eprubete cu tub Durham și se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

43. *Bulion Mac. Conkey* (pentru coliformi și Escherichia coli)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 20 g |
| lactoză | 10 g |
| bilă bou uscată | 5 g |
| bromcresol purpur | 0,01 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |
| pH 7,1± 0,1 | |

Mediul se repartizează în eprubete (16/160) sau flacoane, ambele prevăzute în interior cu tub Durham. Sterilizare la autoclav 15 minute la 121°C și răcire rapidă.

44. *Bulion malonat (reacții* biochimice ale Enterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| extract de drojdie | 1 g |
| sulfat de amoniu | 2 g |
| fosfat dipotasic | 6 g |
| fosfat monopotasic | 0,4 g |
| clorură de sodiu | 2 g |
| malonat de sodiu | 3 g |
| glucoză | 0,25 g |
| albastru de bromtimol, soluție 5‰ (indicator) | 5 ml |
| apă distilată | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele în apă, cu excepția indicatorului. Se ajustează pH-ul la 6,8 se adaugă soluția indicator și se repartizează în eprubete de 12×120 mm. Se sterilizează la temperatura de 121°C timp de 15 minute. Mediul are culoare verde.

45. *Bulion manită* (pentru preîmbogățire Salmonella în alimente)

| | |
|---|---|
| bulion nutritiv cu pH 7,2 | 1 000 ml |
| manită | 5 g |

Manita se adaugă în bulionul nutritiv, se repartizează și se sterilizează la temperatura de 120°C timp de 15 minute.

46. *Bulion nutritiv*

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 17 g |
| peptonă din soia | 3 g |
| dextroză | 2,5 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| clorură de sodiu | 5 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 2,5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH 7,3± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

47. *Bulion nutritiv cu emulsie de gălbenuș de ou și polimixină B, simplu și dublu concentrat*

| | |
|---|---|
| bulion nutritiv cu pH 7,1± 0,1 | 90 cm³ |
| emulsie de gălbenuș de ou 20% | 10 cm³ |
| sulfat de polimixină B, sol. 1% | 1 cm³ |

A. Emulsie de gălbenuș de ou, soluție 20%

Oul se șterge cu vată îmbibată de alcool, se separă gălbenușul de albuș, se introduce gălbenușul într-un vas Erlenmayer cu bile de sticlă sterile, se adaugă 40 ml soluție fizologică sterilă și se omogenizează. Emulsia se păstrează la +40°C, maximum 10 zile.

B. Sulfat de polimixină B, soluție 1‰

O tabletă sulfat de polimixină B cu un conținut de 0,03846±0,002 g substanță activă, se mojarează cu 40 ml apă. Soluția se păstrează la +4°C maximum 14 zile.

În momentul folosirii, la 90 ml bulion nutritiv se adaugă 10 ml emulsie de gălbenuș de ou și 1 ml soluție sulfat de polimixină B, se omogenizează și se repartizează cîte 10 ml în eprubete.

48. *Bulion Oosterom modificat* (pentru îmbogățire Campylobacter)

Bulion tioglicolic la care se adaugă :

| | |
|---|---|
| sînge defibrinat de cal | 7% |
| bilă | 1,5% |
| vancomicină | 40 µg/ml |
| polimixină B | 10 U.I./ml |
| trimetoprim | 10 µg/ml |
| ciclohexiimid | 100 µg/ml |

49. *Bulion peptonă — sorbitol — săruri biliare*

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 2,23 g |
| $NaH_2PO_4$ | 1,2 g |
| NaCl | 5 g |
| D-sorbitol | 10 g |
| săruri biliare | 1,5 g |
| peptonă | 5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Sterilizare la 121°C pentru 15 minute.

50. *Bulion — peptonă triptică — dextroză*

| | |
|---|---|
| peptonă triptică | 10 g |
| dextroză | 5 g |
| extract drojdie | 1 g |
| fosfat de potasiu bibazic ($K_2HPO_4$) | 1,25 g |

Se dizolvă ingredientele prin fierbere. Se repartizează în eprubete de 12/120 mm. Se sterilizează în autoclav la 120°C timp de 20 minute. Înainte de a fi întrebuințat se regenerează prin fierbere timp de 20 minute.

51. *Bulion preîmbogățire* (Salmonella în apă)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | 9 g |
| $KH_2PO_4$ | 195 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele în apă prin încălzire. Se ajustează pH-ul la 7,2± 0,1.

52. *Bulion sorbitol — săruri biliare* (mediu de îmbogățire I pentru Yersinia enterocolitica)

| | |
|---|---|
| fosfat bibazic de sodiu ($Na_2HPO_4$ anhidru) | 8,23 g |
| fosfat monobazic de sodiu ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) | 1,2 g |
| NaCl | 5 g |
| D-sorbitol | 10 g |
| săruri biliare | 1,5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Sterilizare la 121°C pentru 15 minute.

53. *Bulion selenit de sodiu* (pentru îmbogățirea Salmonella)

| | |
|---|---|
| Soluția I | |
| selenit de sodiu ($NaHSeO_3$) | 2 g |
| apă distilată | 100 $cm^3$ |
| Soluția II | |
| lactoză | 2 g |
| peptonă | 2,5 g |
| fosfat disodic | 6,3 g |
| fosfatmonosodic | 2,7 g |
| apă distilată | 400 $cm^3$ |

Toate ingredientele soluției I se fierb la 100°C timp de 30 minute. Toate ingredientele soluției II se solvă la cald, se filtrează prin hîrtie de filtru, se ajustează pH-ul la 7—7,2 se sterilizează la 110°C timp de 30 minute.

În momentul întrebuințării se amestecă soluția I cu soluția II și se repartizează în mod steril în flacoane de 1 $dm^3$.

54. *Bulion — selenit — cistina* (îmbogățire Salmonella)

| | |
|---|---|
| Soluția I | |
| selenit acid de sodiu | 2 g |
| apă distilată | 100 ml |
| Soluția II | |
| lactoză | 2 g |
| peptonă | 2,5 g |
| monohidrogenfosfat de sodiu | 2,5 g |
| dihidrogen fosfat de sodiu | 2,5 g |
| L-cistină | 0,02 g |
| apă distilată ad | 400 ml |

Soluțiile I și II se sterilizează separat la 100°C timp de 20 minute la autoclav cu capacul deschis, după care se amestecă și se repartizează în eprubete și flacoane. Nu se ajustează pH-ul.



Scanned with OKEN Scanner

55. *Bulion selenit de stronțiu* (pentru îmbogățire Salmonella typhi în apă)

| | |
|---|---|
| triptonă | 5 g |
| NaCl | 8 g |
| selenit de stronțiu | 2 g |
| $Na_2HPO_4$ | 0,5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Selenitul de stronțiu se dizolvă în apă fără încălzire. pH-ul se ajustează la $6,8 \pm 0,1$.

56. *Bulion — spălare membrane filtrante*

| | |
|---|---|
| peptonă din carne | 5 g |
| extract de carne | 3 g |
| polysorbat 80 (Tween 80) | 1 ml |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH $6,9 \pm 0,1$ ; sterilizare 15 minute la 121°C.

După filtrarea materialului de cercetat se spală cu acest bulion de 3 ori (de fiecare dată 100 ml) filtrul ; această filtrare este mai ales utilă pentru produsele farmaceutice uleioase ca vaselina, parafina etc. Prin conținutul lor protejează bacteriile care au suferit prin mecanismul filtrării și emulsionează hidrocarburile superioare.

57. *Bulion — tetrationat Müller-Kauffman* (îmbogățire Salmonella)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 2,5 g |
| peptonă din carne | 2,5 g |
| săruri biliare | 1,0 g |
| carbonat de calciu | 10 g |
| tiosulfat de sodiu | 19 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

Mediul se sterilizează prin fierbere ; după răcire la 45°C se adaugă 20 ml soluție iod-iodură de potasiu (iod 6g, iodură de potasiu 5 g, apă distilată 20 ml) și 10 ml soluție verde briliant 0,1%. Mediul se repartizează steril în eprubete și flacoane sterile.

58. *Bulion tetrationat de potasiu conform formulei lui Preuss* (mediu de îmbogățire Salmonella)

| | |
|---|---|
| peptonă | 8,6 g |
| NaCl | 6,4 g |
| Tetrationat de potasiu | 20 g |
| Cristal violet | 0,005 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH-ul este ajustat la $6,5 \pm 0,1$

Componentele deshidratate sterile sînt dizolvate în apă fără încălzire.

59. *Bulion tripticar* (pentru îmbogățire bacteriofagi enterici)

| | simplu | dublu concentrat |
|---|---|---|
| peptonă tripticar | 20 g | 40 g |
| clorură de sodiu | 3 g | 6 g |
| apă | 1 000 $cm^3$ | 1 000 $cm^3$ |

Mod de preparare : componentele se dizolvă în apă și se ajustează pH-ul la 7,2—7,3. Se repartizează în flacoane și eprubete care se sterilizează la 120°C timp de 20 minute.

60. *Bulion pentru decelarea ureazei* (pentru Yersinia enterocolitica)

| | |
|---|---|
| uree | 5 g |
| apă distilată | 50 ml |
| soluție stoc de roșu fenol | 5 ml |

pH-ul este ajustat cu soluție 1 N de HCl la 5,0.

Prepararea soluției roșu fenol : se dizolvă 0,1 g roșu fenol în 28,2 ml soluție 0,01 N de NaOH și se diluează la 250 ml cu apă distilată.

61. *Bulion VF cu acid tioglicolic și albastru de metilen* (anaerobi sulfito-reducători)

| | |
|---|---|
| carne de mînzat | 1 000 g |
| ficat de vită | 500 g |
| pepsină 1/3 500 | 5,7 g |
| apă de la robinet la 50°C | 5 000 ml |
| acid clorhidric d = 1,19 | 50 ml |

Amestecul se ține la termostat 48 h, la 37°C, se sifonează lichidul clar, se ridică temperatura la 60°C, se ajustează pH-ul la 7,9—8,0, se fierbe 15 minute, se filtrează prin hîrtie de filtru, se repartizează în baloane și se sterilizează 30 minute la 105°C. Pentru prepararea mediului în tuburi, în vederea cultivării de condiții anaerobe, se repartizează în eprubete de 16/160 mm carne uscată, astfel încît să acopere un volum de aproximativ 1—2 ml, peste care se toarnă cîte 15 ml din amestecul următor, agitat în prealabil :

| | |
|---|---|
| bulion VF | 1 000 ml |
| agar | 0,5 g |
| acid tioglicolic | 0,6 ml |
| albastru de metilen sol. 1% | 0,2 ml |
| glucoză | 10 g |

Înainte de însămînțare, mediul se regenerează prin fierbere, timp de 10 minute la 100°C (într-o baie de apă). Mediul se poate folosi atît timp cît culoarea verde de la suprafață depășește 1/4—1/3 din înălțimea coloanei de mediu.

62. *Bulion de îmbogățire (III)* (pentru Yersinia enterocolitica)

| | |
|---|---|
| sorbitol | 1,6 g |
| peptonă | 0,2 g |
| triptonă | 0,2 g |
| extract de drojdie | 0,3 g |
| NaCl | 0,5 g |
| dezoxicolat de sodiu | 0,1 g |
| albastru de bromtimol | 0,007 g |

După dizolvarea ingredientelor pH-ul este ajustat la 7,0 cu soluție 1 N de NaOH. Mediul este încălzit cu amestecare și trebuie să fiarbă 1 minut.

63. *Geloză — lactoză — eozină — albastru de metilen* (GEAM, Levine) (pentru Escherichia coli, coliformi și Candida)

| | |
|---|---|
| peptonă din carne | 10 g |
| lactoză | 10 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 2 g |
| eosină solubilă | 0,4 g |
| albastru de metilen | 0,065 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| agar-agar pulvis | 13,5 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH-ul 7,0±0,2 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C. Escheria coli : colonii cu luciu metalic (picătură de fuxină). Pentru Candida : după autoclavare se adaugă 100 mg/l aureomicină.

64. *Geloză lactozată cu fucsină și sulfit de Na (mediul Endo)* (coliformi și Escherichia coli)

Compoziție :

| | |
|---|---|
| geloză | 100 $cm^3$ |
| fucsină, sol. saturată | 0,5 $cm^3$ |
| sulfit de sodiu sol. 10% | 1,25 $cm^3$ |
| lactoză, sol. 30% sterilă | 5 $cm^3$ |
| Geloza : | |
| macerat de carne | 1 000 $cm^3$ |
| agar | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| peptonă | 5 g |

Se amestecă componentele, se fierbe pînă la dizolvarea agarului și se aduce cu apă la volumul inițial. Soluția se filtrează. Filtratul se aduce la pH = 7,4± 0,2. Se repartizează cîte 100 $cm^3$ în flacoane care se sterilizează la 121°C timp de 15 minute.

65. *Geloza 2% Martin*

Conține : bulion cu peptonă Martin, agar, pH 7,4± 0,1

Mediul cu largă utilizare în bacteriologia generală pentru cultivarea microorganismelor. Mediu de pornire pentru prepararea mediilor necesare cultivării germenilor anaerobi.

A) — Pentru bacterii anaerobe sporulate (genul Clostridium) :

— Mediul Nagler (geloză 2% Martin, emulsie gălbenuș de ou, glucoză).

— Mediul Willis-Hobbs (geloză 2% Martin, lactoză, soluție roșu neutru, lapte, gălbenuș de ou).

Germeni lecitinază pozitivi : Cl. perfringens, Cl. oedematiens, Cl. bifermentans, Cl. sporogenes, Cl. histolyticum.

Germeni lactoză pozitivi : Cl. perfringens, Cl. septicum.

Germeni anaerobi cu activitate proteolitică (zonă clară în jurul coloniei) : Cl. perfringens, Cl. bifermentans, Cl. histolyticum.

B) — Pentru germeni anaerobi nesporulați :

1) Mediul Béerens (geloză 2% Martin, glucoză, sînge de oaie). Acest mediu favorizează creșterea germenilor anaerobi sporulați și nesporulați.

2) Mediul Béerens cu adaus de azid de sodiu și bilă : precipitat în jurul coloniilor care aparțin grupului Bacteroides (mai ales B. fragilis).

3) Mediul Béerens cu adaus la azid de sodiu, bilă de bou, kanamicină, streptomicină, neomicină, polimixină B : selectiv pentru B. fragilis.

4) Mediul Béerens cu adaus de hemină și menadionă : favorizează creșterea și producerea pigmentului negru de către B. melaninogenicum.



Scanned with OKEN Scanner

5) Mediul Béerens cu adaus de azid de sodiu, verde de malahit : inhibă creșterea majorității grupului Bacterioides.

6) Laptele-cisteinat (Béerens-Tahon-Caspel) :

| | |
|---|---|
| lapte ecremat | 1 000 ml |
| cisteină clorhidrică | 0,8 g |
| pH 7,3—7,4 | |

Se repartizează 12 ml în eprubete 16/160 mm, sterilizare 30 minute la 115°C.

67. *Geloză nutritivă*

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 15 g |
| peptonă din soia | 5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| agar-agar pulvis | 13 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH 7,3± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

Ambele medii de cultură nu conțin inhibitori și au o întrebuințare universală. La geloza nutritivă adăugînd 5—10% sînge defibrinat, lichid ascitic sau ser, se pot izola germeni mai pretențioși privind factorii nutritivi (pneumococi, streptococi, neisserii, brucele, corynebacterii etc.). Folosind metodele clasice sau actuale pentru anaerobioză se pot izola și unii germeni anaerobi.

68. *Geloza nutritivă glucozată* (pentru NTG)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 5 g |
| extract drojdie | 2,5 g |
| dextroză | 1 g |
| agar-agar pulvis | 14 g |

pH 7,0± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

69. *Geloza Tioglicolat* după Brewer (pentru creșterea clostridiilor și altor microrganisme anaerobe la suprafața culturii).

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 10 g |
| peptonă din soia | 5 g |
| extract drojdie | 5 g |
| L-cistină | 0,5 g |
| D(+) glucoză | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| tioglicolat de sodiu | 2 g |
| natriumsulfoxylatformaldehyd | 1 g |
| albastru de metilen | 0,002 g |
| agar-agar pulvis | 12,6 g |

pH 7,2± 0,2. Mediul sterilizat prin autoclavare se repartizează în plăci Pétri în strat subțire. Mediul se termostatează în condițiile de anaerobioză cunoscute.

70. *Geloza — verde briliant* (pentru Salmonella)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 5 g |
| peptonă peptică din carne | 5 g |
| extract drojdie | 3 g |
| lactoză | 10 g |
| zaharoză | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| roșu fenol | 0,08 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| verde briliant | 0,0125 g |
| agar-agar pulvis | 13 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 6,9± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

71. *Mediul albumină Tween 80 modificat de Johnson & Harris* (pentru leptospire))

a) Soluții stoc :

10 soluții stoc sînt preparate utilizînd următoarele cantități pentru 100 ml apă distilată :

| | |
|---|---|
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,4 g |
| $NH_4Cl$ | 25 g |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 1 g |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1 g |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,5 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,3 g |
| glycerol | 10 g |
| tween 80 | 10 g |
| thiamină | 0,5 g |
| cyanocobalamină (vitamină $B_{12}$) | 0,02 g |

pH-ul soluțiilor stoc nu cere ajustare.

b) Amestecul de bază (A)

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 1 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,3 g |
| NaCl | 1 g |
| apă distilată | 997 ml |

Cînd aceste săruri au fost dizolvate se adaugă 1 ml din următoarele soluții stoc : $NH_4Cl$, thiamină și glycerol. Se ajustează pH-ul și se sterilizează prin autoclavare.

c) Suplimentul de albumină (B) este preparat prin adăugarea albuminei bovine, fracțiunea V la 100 ml apă distilată. Cînd aceasta s-a dizolvat se adaugă următoarele soluții stoc încet, în timp ce soluția de albumină este agitată.

| | |
|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 2 ml |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 2 ml |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2 ml |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,2 ml |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 20 ml |
| Cyanocobalamin | 2 ml |
| Tween 80 | 25 ml |

pH-ul este ajustat la 7,4 și volumul total este adus la 200 ml. Se sterilizează prin filtrare.

d) Mediul complet constă din 1 volum B și 9 volume A. Substratul poate fi utilizat cu sau fără adăugare de pyruvat de sodiu (100 $\mu g \cdot 1^{-1}$). S-a raportat că adăugarea a 5-fluorouracil (100 $\mu g/ml^{-1}$) dă mediului un grad sigur de selectivitate.

72. *Mediul cu alcool 3%* (pentru Candida)

| | |
|---|---|
| alcool etilic | 3% |
| sulfat de amoniu | 0,1% |
| sulfat monopotasic | 0,1% |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| sulfat de magneziu în apă de robinet | 0,01% |

73. *Medii pentru Brucella*

| | mediul lichid | solid |
|---|---|---|
| extract de carne | 5 g | 5 g |
| peptonă de carne | 10 g | 10 g |
| peptonă din drojdie | 10 g | 10 g |
| glucoză | 10 g | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g | 5 g |
| geloză fibre | — | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml | 1 000 ml |

Se sterilizează la autoclav, pH final 7,0 ; se adaugă ser de bou (inactivat la 56°C) în proporție de 5%. Pentru mediu selectiv la 1 kg mediu de bază gelozat se adaugă : Bacitracină 25 000 U.I. ; Cicloheximidă (actidion) 100 mg ; Polimixină B 5—6 000 U.I. ; Cristal violet 1,4 mg.

74. *Mediul Butzler* (pentru Camphylobacter)

Geloză de bază cu tioglicolat de sodiu la care se adaugă :

| | |
|---|---|
| bacotraconă | 25 UI/ml |
| novobiocină | 5 µg/ml |
| actidin | 50 µg/ml |
| colistin | 10 UI/ml |
| cefazolin | 15 µg/ml |
| sînge de berbec | 10% |

75. *Mediul Campy-BAP* (pentru Camphylobacter)

Brucella — agar ca mediu de bază la care se adaugă :

| | |
|---|---|
| vanomicină | 10 µg/ml |
| trimetoprim | 5 µg/ml |
| polimixină B | 2,5 UI/ml |
| amfotericin B | 2 µg/ml |
| cefalotin | 15 µg/ml |
| sînge de berbec | 10% |

76. *Mediul Campy-IC* (Institutul „Cantacuzino") suplimentat cu sînge de berbec 7—10% (pentru Campylobacter)

| | |
|---|---|
| vanomicină sau rifampicină | 10 µg/ml |
| cefalotin | 15 µg/ml |
| trimetoprim | 5 µg/ml |
| colistin | 10—15 UI/ml |

77. *Mediul CETRIMID-AGAR* (mediu selectiv pentru Pseudomonas aeruginosa)

| | |
|---|---|
| peptonă din gelatină | 20 g |
| clorură de magneziu | 1,4 g |
| N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid | 0,5 g |
| agar-agar pulvis | 13,6 g |

pH 7,2± 0,2 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

78. *Mediul CHO* (mediul pentru fermentarea anerobă)

| | |
|---|---|
| peptonă din cazeină | 15 g |
| extract de drojdie | 7 g |
| L-cisteină | 0,5 g |
| clorură de sodiu | 2,5 g |
| acid ascorbic | 0,1 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| tioglicolat de sodiu | 0,5 g |
| albastru de bromtimol | 0,01 g |
| agar-agar pulvis | 0,3 g |

pH 7,5± 0,1. Mediul se repartizează în eprubete de 16/160 (5 cm înălțime) și se autoclavează 15 minute la 121°C. După autoclavare mediul se răcește la aproximativ 50°C și se adaugă carbohidratul respectiv (concentrație finală 5—10 g la litru), după care se pipetează oleu de parafină steril în strat de 1 cm înălțime sau dacă este posibil se utilizează pentru termostatare sistemul „anaerocult" A, P sau C. Mediul se însămînțează cu ansa ; termostatare cel puțin 48 h.

79. *Mediul cu citrat (Simmons)* : reacții biochimice ale Enterobacteriaceelor

| | |
|---|---|
| clorură de sodiu | 5 g |
| sulfat de magneziu | 0,2 g |
| fosfat de amoniu ($NH_4H_2PO_4$) | 1 g |
| fosfat dipotasic | 1 g |
| citrat de sodiu | 2 g |
| agar-agar | 20 g |
| albastru de bromtimol, sol. 2‰ (indicator) | 40 ml |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele în apă, se adaugă agarul, se fierbe la temperatura de 100°C timp de 20 minute și se ajustează pH-ul la 6,8—7 apoi se adaugă indicatorul, se repartizează în eprubete și se sterilizează la 121°C timp de 20 minute. Eprubetele se așază în poziție înclinată și se lasă să se solidifice mediul. Mediul are culoarea verde închis.

80. *Mediul mCp* (pentru Clostridium perfringens)

| | |
|---|---|
| triptoză | 3 g |
| extract de drojdie | 2 g |
| sucroză | 0,5 g |
| L-cisteină | 0,1 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,01 g |
| bromcresol purpur | 0,004 g |
| agar | 1,5 g |
| apă distilată | 90 ml |

pH = 7,6, sterilizare la 120°C pentru 20 minute. Se răcește la 50°C și se adaugă următoarele antibiotice și soluții sterilizate prin filtrare :

| | |
|---|---|
| D-cicloserină | 40 mg |
| polimixină B sulfat | 2,5 mg |
| indoxil -d-glucozidă, dizolvată în 8 ml apă distilată sterilă | 60 mg |
| soluție 0,5% de fenolftaleină difostat | 2 ml |
| soluție 4,5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,2 ml |

81. *Mediul Dorset* (pentru întreținerea Salmonellelor)

Compoziție :

3 părți ou
1 parte ser fiziologic 9‰



Scanned with OKEN Scanner

82. *Mediul DRCA* (agar-glucoză-amidon-sulfit-cisteină) cu neomicină și polimixină B (pentru Clostridii)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| extract de carne (pastă) | 10 g |
| extract de drojdie | 1,5 g |
| acetat de sodiu hidratat | 5 g |
| amidon solubil | 1 g |
| glucoză | 1 g |
| cisteină | 0,5 g |
| agar-agar | 15 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |
| sulfat de polimixină B, soluție 0,1% | 2 ml |
| citrat feric, sol 7% | 1 ml |
| sulfat de neomicină, sol. 0,5%. | 1 ml |
| sulfit de sodiu, sol. 4% | 1 ml |

Se dizolvă peptona, extractul de carne, extractul de drojdie, acetatul de sodiu și agarul în 800 ml apă, la fierbere. Se adaugă amidonul în puțină apă rece și apoi se completează la 200 ml, cu apă. Se fierbe pînă se obține o pastă. Se adaugă această pastă la cei 800 ml amestec și se fierbe 30 minute, pentru a se dizolva toate ingredientele ; se adaugă glucoza și cisteina. Se ajustează pH-ul la $7,1 \pm 0,1$. Se sterilizează 15 minute la 120°C. La 100 ml mediu topit și răcit la 47°C se adaugă aseptic 2 ml soluție 0,1 sulfat de polimicină B și 1 ml soluție 0,5% sulfat de neomicină, 1 ml citrat feric, soluție 7%, 1 ml sulfit de sodiu, soluție 4%, sterilizate prin filtrare. Se repartizează cîte 15 . . . 10 ml în eprubete de 16/160 mm în așa fel încît mediul să ocupe 3/4 din înălțimea eprubetelor.

83. *Mediul extract de drojdie-agar-tetraciclină* (drojdii și mucegaiuri)

| | |
|---|---|
| extract de drojdie | 5 g |
| glucoză | 20 g |
| agar | 15 g |
| apă | 10 003 ml |

Se dizolvă în 200 ml apă caldă extractul de drojdie, glucoza și agarul, se adaugă restul de apă, se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 15 minute. În momentul folosirii, la 9 volume mediu topit și răcit la $47 \pm 1$°C se adaugă în mod aseptic un volum de soluție 0,1% clorhidrat de tetraciclină (mediul trebuie să conțină 100 u.i. clorhidrat de tetraciclină activ într-un ml mediu) preparată astfel :

Într-o eprubetă sterilă se cîntăresc 0,11 mg clorhidrat de tetraciclină, cu precizie de 0,1 mg, care se dizolvă în 100 ml apă sterilă. Stabilitatea acestei soluții, păstrată la temperatura de + 4°C este de 14 zile. Amestecul de mediu antibiotic se pregătește numai în cantitatea necesară.

84. *Mediul ETGPA — Baird Parker :* agar, gălbenuș de ou, telurit de potasiu, glicină, piruvat de sodiu (pentru Staphylococcus aureus)
Mediul de bază :

| | |
|---|---|
| extract de carne (pastă sau deshidratat) | 5 g |
| triptonă | 10 g |
| extract de drojdie | 1 g |

| | |
|---|---|
| clorură de litiu | 5 g |
| agar-agar | 15—20 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele în apa adusă la fierbere, se răcește mediul la 50—60°C și se ajustează pH-ul la 6,8± 0,1. Se repartizează cîte 90 ml în baloane de 200 ml și se sterilizează la 121°C timp de 15 minute.

În baloane conținînd 90 ml mediu de bază, în prealabil topit și răcit la 45± 0,1°C se adaugă aseptic următoarele :

| | |
|---|---|
| glicerină, sol. 20% sterilizată la 121°C 15 min | 6 ml |
| telurit de potasiu, sol. 1% sterilizată prin filtrare | 1 ml |
| piruvat de sodiu, sol. 20% sterilizată prin filtrare | 5 ml |
| emulsie de gălbenuș de ou | 5 ml |

Emulsia de gălbenuș de ou : ouă proaspete de găină, cu coaja intactă, se spală cu o soluție 1% sublimat corosiv ($HgCl_2$) timp de aproximativ 1 minut. Se sparg aseptic și se separă gălbenușul de albuș. Se emulsionează 3 părți gălbenuș în 7 părți ser fiziologic (v/v), prin agitare puternică într-un balon Erlenmeyer, în care s-au introdus bile de sticlă sau într-un omogenizator electric. Baloanele se agită pentru omogenizare și se toarnă mediul imediat, cîte 15 ml în cutii Pétri. Mediul se va folosi imediat sau cel mult 24 h de la preparare, cu condiția păstrării la 4—6°C.

85. *Mediul cu fenilalanină* (reacții biochimice ale Enterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| extract de drojdie | 3 g |
| fosfat disodic | 1 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| L-fenilalanină | 1 g |
| sau | |
| DL-fenilalanină | 2 g |
| agar-agar | 15 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele prin fierbere în apă, se filtrează și se ajustează pH-ul la 6,8 se repartizează cîte 5—6 ml în eprubete de 16/160 mm ; se sterilizează la 121°C timp de 10 minute. Mediul are culoarea albă cu nuanță gălbuie și se păstrează maximum 30 zile la temperatura de 4—6°C.

86. *Mediul Giolitti Cantoni* (pentru Staphylococcus aureus)

| | |
|---|---|
| triptonnă | 10 g |
| extract de carne (pastă sau deshidratat) | 5 g |
| extract de drojdie | 5 g |
| clorură de litiu | 5 g |
| D-Manită | 20 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| glicină (glicoçol) | 1,2 g |
| pirutat de sodiu | 3 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se amestecă componentele, se fierb și se agită pînă la dizolvare completă. Se răcește amestecul la 20—25°C, se ajustează pH-ul la 6,9± 0,1. Se

repartizează cîte 20 ml mediu în eprubete și se sterilizează la 115°C timp de 20 minute. Înainte de folosire, mediul se fierbe 20 minute la 100°C, se răcește la 25°C și se adaugă în fiecare eprubetă cîte 0,1 ml telurit de potasiu, soluție 1%.

87. *Mediul pentru fermentarea hidraților de carbon*

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| albastru de bromtimol, sol. 2‰ (indicator) | 12 ml |
| hidrat de carbon (glucoză, zaharoză, lactoză sau maltoză | 10 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Se dizolvă componentele în apă prin fierbere, cu excepția indicatorului și a hidraților de carbon, se ajustează pH-ul la 7,4± 0,1 se filtează prin vată, în baloane în care s-a introdus cîte unul din hidrații de carbon; se adaugă soluția indicator, agitînd ușor, se repartizează cîte 2—3 ml în eprubete de 12/120 mm și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute. Mediul are culoare albastră cu nuanță verzuie și se poate păstra la 4°C timp de maximum 30 zile.

88. *Mediul hiperclorurat lichid* (mediu selectiv pentru Staphylococcus aureus)

| | |
|---|---|
| extract de carne (pastă sau deshidratată) | 5 g |
| petonă | 10 g |
| clorură de sodiu | 150 g |
| lactoză | 15 g |
| agar | 1 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se amestecă componentele, cu excepția clorurii de sodiu, se fierb pînă la dizolvarea completă a agarului. Se adaugă clorura de sodiu, se agită pînă la dizolvare, se ajustează pH-ul la 7,3± 0,1 și mediul încă fierbinte se filtrează prin vată și se repartizează cîte 10—12 ml în eprubete. Se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

89. *Mediu hiperclorurat sodiu (Chapman)* (mediu selectiv pentru Staphylococcus aureus manito-pozitiv)

| | |
|---|---|
| peptonă din cazeină | 10 g |
| extract drojdie | 2,5 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 5 g |
| gelatină | 30 g |
| lactoză | 2 g |
| d(-) manită | 10 g |
| clorură de sodiu | 75 g |
| agar pulvis | 12 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,0± 2; sterilizarea prin autoclavare 15 minute la 121°C.
stafilococii patogeni : galben auriu
descompunerea manitei : o picătură din soluția albastru bromtimol 0,4% picurată pe colonie virează spre galben (acidifiere).



Scanned with OKEN Scanner

gelatinoliza : apariţia unei zone clare în jurul coloniei în interval de 10 minute după picurarea unei soluţii de acid sulfosalicilic 20% sau ammonium sulfat (soluţie concentrată).

90. *Mediul hiperclorurat solid (Chapman)* (varianta IC)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 4 g |
| peptonă | 10 g |
| clorură de sodiu | 75 g |
| manită | 10 g |
| agar fillis | 20 g |
| roşu fenol | 0,025 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,6 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

91. *Mediul Istrati-Meitert* (mediu cu bilă uscată pentru Salmonella, Shigella, Pseudomonas)

| | |
|---|---|
| geloză nutritivă | 1 000 ml |
| lactoză | 15 g |
| bilă uscată de bou (sau Bacto Bille Salts) | 8 g |
| citrat de sodiu | 8 g |
| tiosulfat de sodiu | 8 g |
| citrat de fier | 2 g |
| albastru de bromtimol soluţie 0,2% | 40 ml |
| pH 7,4 | |

Ingredientele se adaugă la geloza nutritivă, se fierb 15 minute după care se toarnă în plăci Pétri.

Pseudomonas sp. creşte sub formă de colonii mici, albastre, foarte aderente la mediu ; poate fi folosit şi ca unic mediu de izolare pentru Pseudomonas fiind la îndemîna oricărui laborator.

92. *Mediul Korthof* (leptospire)

| | |
|---|---|
| peptonă | 0,9 g |
| NaCl | 1,4 g |
| $NaHCO_3$ | 0,02 g |
| KCl | 0,04 g |
| $CaCl_2$ | 0,04 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,24 g |
| $Na_2HPO_4$ | 0,88 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH-ul este ajustat la $7,3 \pm 0,1$

Se adaugă ser de iepure lipsit de anticorpi.

93. *Mediul Koser* (reacţii biochimice ale Esterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| clorură de sodiu | 5 g |
| sulfat de magneziu | 0,2 g |
| dihidrogen-fosfat de amoniu | 1 g |
| dihidrogen-fosfat de potasiu | 1 g |
| citrat de sodiu | 5 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

pH = 6,8 ; sterilizare la 121°C timp de 15 minute.



Scanned with OKEN Scanner

94. *Mediul lapte steril*

a) Lapte degresat steril
turnesol sol. 1% sterilă

Laptele fiert degresat se repartizează în eprubete 16/160 mm. Se sterilizează la 105—110°C timp de 20 minute. Înainte de întrebuințare se adaugă cîteva picături de soluție de turnesol pînă la apariția culorii mov deschis.

Turnesolul sub formă de granule sau pulbere se mojarează se adaugă un volum de 3 ori mai mare de alcool etilic 96% și se ține la 37°C timp de 3 zile. Zilnic se îndepărtează alcoolul și se înlocuiește cu alcool proaspăt în aceeași cantitate. După decantarea părții lichide (după 3 zile) sedimentul se usucă și se adaugă un volum de apă distilată egal cu volumul alcoolului folosit într-o zi. Se menține încă 3 zile la 37°C, agitîndu-se din cînd în cînd. Se filtrează prin hîrtie de filtru cu porozitate mare, se completează cu apă, la volumul inițial și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute.

b) Lapte praf degresat 100 g
turnesol 5 g

Se adaugă componentele la 1 litru apă distilată. Se filtrează prin tifon, se repartizează cîte 10 $cm^3$ și se sterilizează la autoclav la temperatura de 110°C timp de 20 minute. La încălzire coloratia dispare, la răcire coloratia violet apare.

c) Se poate folosi lapte praf sau lapte dulce degresat repartizat în eprubete de 16/160 mm cîte 10 $cm^3$ fără adăugare de turnesol. Se sterilizează la 110°C timp de 20 minute cu atenție pentru a nu depăși această temperatură, peste care cazeina se peptonizează, iar lactoza se caramelizează.

Înainte de utilizare, eprubetele cu lapte turnesolat sau lapte simplu se regenerează, prin fierbere timp de 20—30 minute, după care se răcesc brusc și se însămînțează.

95. *Mediu Dr. Leuconostoc* (îmbogățire)

proteoză-peptonă 15 g
apă 1 000 $cm^3$
pH 7,0 ± 0,2

Se dizolvă ingredientele prin fierbere. Se repartizează în vase Erlenmayer de 200 ml și se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

96. *Mediu agar-zaharoză (Leuconostoc)*

peptonă 10 g
zaharoză 120 g
agar fibre 20 g
apă 1 000 $cm^3$
pH 7,1 ± 0,2

Se dizolvă ingredientele prin fierbere, se repartizează și se sterilizează în autoclav la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

97. *Mediul Lödder I* (Candida)

geloză spălată 20 g
sulfat de amoniu 2 g
fosfat monopotasic 1,5 g
sulfat de magneziu 0,25 g
apă bidistilată 1 000 ml

98. *Mediul Lödder II* (Candida)

| | |
|---|---|
| geloză spălată | 20 g |
| glucoză purissima | 20 g |
| fosfat monopotasic | 1,5 g |
| sulfat de magneziu | 0,25 g |
| apă bidistilată | 1 000 ml |

99. *Mediul MacConkey* (Salmonella, Shigella, coliformi)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 17 g |
| peptonă din carne | 3 g |
| lactoză | 10 g |
| săruri biliare | 1,5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| roşu neutru | 0,03 g |
| cristal violet | 0,001 g |
| agar-agar pulvis | 13,5 g |

pH 7,1 ± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.
germeni lactoză pozitivi : colonii mici cu centru roşu
germeni lactoză-negativi : colonii semitransparente, de mărimi variabile, fără să producă modificări de culoare ale mediului.

100. *Mediul MILF (mobilitate-indol-lizindecarboxilază-fenil-alanin-deaminază)*

| | |
|---|---|
| extract de drojdie | 3 g |
| glucoză | 0,75 g |
| L-lizin | 5 g |
| DL-triptofan | 0,1 g |
| Dl-phenilalanină | 4 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| agar-agar | 3 g |
| bromcrezol purpur sol. 1 : 500 $cm^3$ | 8 $cm^3$ |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ |

Se dizolvă substanţele la cald ; se ajustează pH-ul la 6,8 şi se adaugă soluţia de bromcrezol purpur. Se sterilizează în eprubete de 12/120 mm, în coloană dreaptă, 30 minute la 110°C.

101. *Mediul MIU* (mobilitate, indol, urea) reacţii biochimice ale Enterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| proteoză peptonată | 30 g |
| fosfat monopotasic ($KH_2PO_4$) | 2 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| agar-agar | 3,5 g |
| glucoză | 0,5 g |
| roşu fenol (indicator) | 0,008 g |
| apă pînă la | 1·000 ml |

Componentele se dizolvă în apă, la cald, cu excepţia indicatorului, se ajustează pH-ul la 0,7 ± 0,1 se filtrează prin vată, după care se adaugă indicatorul şi se sterilizează 30 minute la 110°C. În momentul folosirii, se adaugă în mod aseptic pentru 100 ml mediu topit şi răcit la 47°C cîte 10 ml uree soluţie 20%, sterilizată prin filtrare. Cîte 5 ml mediu se repartizează în eprubete de 12/120 mm, în mod aseptic şi se lasă să



Scanned with OKEN Scanner

se solidifice în poziție verticală. Mediul are culoare galben-maroniu și este transparent.

102. *Mediul Möller pentru decarboxilarea lizinei* (reacții biochimice ale Enterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| peptonă | 5 g |
| extract de carne | 5 g |
| glucoză | 0,5 g |
| piridoxal | 0,005 g |
| bromcrezol purpur 2‰ (indicator) | 5 ml |
| crezol roșu sol. 0,2% (indicator) | 2,5 ml |
| lizină | 10 g |
| apă pînă la | 1 000 ml |

Se dizolvă în apă componentele, cu excepția lizinei și a indicatorului, se ajustează pH-ul la 6,0± 0,1 se adaugă apoi lizina solubilizată în 2 sau 3 ml apă cu pH-ul ajustat la 6,0. Se repartizează cîte aproximativ 3 ml în eprubete de 12/120 mm, în care se adaugă 0,5 ml ulei de parafină. Se sterilizează 20 minute la 115°C. Mediul are culoare galbenă. Se poate păstra 14 zile la temperatura de 4°C.

103. *Mediul Nagler* (pentru anaerobi)

| | |
|---|---|
| geloză, soluție 2% topită și răcită la 45°C | 450 ml |
| emulsie de gălbenuș de ou în ser fiziologic | 50 ml |
| glucoză, soluție 50% | 10 ml |

Emulsia de gălbenuș de ou : oul foarte proaspăt se spală cu apă și săpun, cu o perie, apoi se lasă în alcool timp de 30 minute. Gălbenușul se separă de albuș în mod steril, se introduce într-un balon cu perle de sticlă sterile, în care se adaugă 25 ml ser fiziologic. Se agită bine. Toate componentele se aduc la temperatura de 45°C se amestecă bine și se toarnă în cutii Pétri.

Pentru a folosi metoda semineutralizării, 1/2 din suprafața mediului Nagler turnat în cutii Pétri și uscat se acoperă cu 0,1—0,5 ml ser antiperfringens care se întinde cu o baghetă sterilă și se lasă să se usuce.

104. *Mediul Nikerson-Mankowski* (dermatofițe, geofili)

| | |
|---|---|
| fosfat monopotasic | 1 g |
| sulfat de amoniu | 1 g |
| biotină | 5 g |
| albastru de tripan | 0,10 g |
| agar-agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Se dizolvă toate substanțele, se autoclavează și se adaugă 20 g glicogen sau amidon purificat și sterilizat prin tindalizare.

105. *Mediul peptonă — sulfit de fier — agar*

| | |
|---|---|
| peptonă | 5 g |
| extract de carne | 5 g |
| sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0,8 g |
| sulfit de sodiu ($Na_2SO_3$) | 1,3 g |
| agar | 15 g |



Scanned with OKEN Scanner

apă distilată 1 000 $cm^3$
pH = 7,2—7,4

Mod de preparare :

| Agar nutritiv de bază | simplu | dublu concentrat |
|---|---|---|
| peptonă | 5 g | 10 g |
| extract de carne | 5 g | 10 g |
| agar | 15 g | 30 g |
| apă distilată | 1 000 $cm^3$ | 1 000 $cm^3$ |

pH = 7,2—7,4

Se dizolvă componentele prin încălzire la fierbere ; se sterilizează prin autoclavare la 120°C timp de 20 minute în cantități corespunzătoare pentru tehnica folosită în flacoane sau tuburi (închise ermetic cu dopuri) și mediul poate fi stocat.

Soluția de sulfit de sodiu :

| | |
|---|---|
| $Na_2SO_3$ | 13 g |
| sau $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ | 26 g |
| apă distilată | 100 $cm^3$ |

Soluția de sulfat feros :

| | |
|---|---|
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 8 g |
| soluție 0,01 M de $H_2SO_4$ | 100 $cm^3$ |

Soluțiile pot să nu fie sterilizate sau dacă se dorește, sterilizarea se va face prin filtrare.

Înainte de utilizare se topesc cantități de agar nutritiv de bază simplu concentrat (I) și dublu concentrat (II) corespunzătoare volumelor de apă de cercetat. Se prepară soluțiile de sulfit de sodiu și sulfat feros și apoi mediul final simplu sau dublu concentrat prin adăugarea soluțiilor la mediul de bază, amestecînd încet pentru a nu introduce aer.

Prepararea mediului de cultură pentru tehnica inoculării în tuburi :

| *Componente* | *Volume în $cm^3$ necesare pentru tuburi* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *16/160 mm 18/180 mm* | | *25/250 mm* | |
| **Mediul I** | 200 | | 350 | |
| **Mediul II** | | 10 | | 50 |
| **Soluție de sulfit de Na** | 2 | 0,2 | 3,5 | 1,0 |
| **Soluție de sulfat feros** | 2 | 0,2 | 3,5 | 1,0 |

Prepararea mediului de cultură pentru tehnica încorporării în placă :

| *Componente* | *Volumul în $cm^3$ necesar pentru plăci Petri cu diametrul de* | |
|---|---|---|
| | *50—60 mm* | *90—95 mm* |
| **Mediul nutritiv de bază I** | 100 | 200 |
| **Soluție de sulfit de sodiu** | 1 | 2 |
| **Soluție de sulfat feros** | | |



Scanned with OKEN Scanner

106. *Mediul PC* (Candida)

| | |
|---|---|
| pulpă de cartof | 20 g |
| pulpă de morcov | 20 g |
| geloză | 20 g |
| apă | 100 ml |

Morcovul și cartoful se macerează timp de o oră în apă ; se fierb 5 minute ; se adaugă 20 g geloză și se lasă 2 ore ; se autoclavează 15 minute la 120°C ; se filtrează prin vată hidrofilă la cald. Se repartizează în tuburi și se sterilizează la 120°C timp de 15 minute.

107. *Mediul PCB (Pankov)* (pentru fungi)

| | |
|---|---|
| bilă de bou proaspătă | 150 g |
| morcovi | 20 g |
| cartofi | 20 g |
| agar-agar | 20 g |
| apă de robinet | 1 000 ml |

108. *Mediul peptonă triptică — extract de drojdie — glucoză — agar*

| | |
|---|---|
| peptonă pancreatică din cazeină | 5 g |
| extract de drojdie | 3 g |
| glucoză | 1 g |
| agar | 15 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

În 200 ml de apă se dizolvă la cald peptona pancreatică, extractul de drojdie și glucoza, completîndu-se apoi cu apă la 1 000 ml. Se aduce pH-ul la 7,0± 0,1 cu o soluție de NaOH 0,1 N, se adaugă agarul, se autoclavează la vapori fluenți timp de 30 minute ; se filtrează la cald prin vată sterilizată la 120°C timp de 20 minute.

109. *Mediul Pseudomonas — agar F* (Pseudomonas aeruginosa)

| | |
|---|---|
| peptonă din cazeină | 10 g |
| peptonă din carne | 10 g |
| sulfat de magneziu | 1,5 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 1,5 g |
| glicerină | 10 ml |
| agar-agar pulvis | 12 ml |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,2± 0,1 ; sterilizare la autoclav 15 minute la 121°C.

110. *Mediu Pseudomonas — agar P* (Pseudomonas aeruginosa)

| | |
|---|---|
| peptonă din gelatină | 20 g |
| clorură de magneziu | 1,4 g |
| sulfat de potasiu | 10 g |
| glicerină | 10 ml |
| agar-agar pulvis | 12,6 g |

pH 7,2± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C. Pseudomonas — agar F favorizează formarea fluoresceinei și reduce formarea piocianinei ; Pseudomonas — agar P favorizează formarea piocianinei și reduce formarea fluoresceinei.

După însămînțare, ambele medii se termostatează 7 zile la 35—37°C urmărindu-se zilnic.

111. *Mediul Sabouraud lichid* (pentru fungi)

| | |
|---|---|
| peptonă sau | 10 g |
| hidrolizat triptic de cazeină | 15 g |



Scanned with OKEN Scanner

| | |
|---|---|
| glucoză | 20 g |
| maltoză | 20 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 5,3—5,7 ; sterilizarea prin autoclavare 15 minute la 121°C.

Mediul bulion glucozat (pentru germeni aerobi)

| | |
|---|---|
| hidrolizat pancreatic din caseină | 15 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| monohidrogenat de potasiu | 2,5 g |
| dextroză | 10 g |
| extract de carne | 10 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,3± 0,3 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

112. *Mediul Sabouraud — 1% glucoză maltoză — agar* (pentru fungi)

| | |
|---|---|
| peptonă din caseină | 5 g |
| peptonă din carne | 5 g |
| D(+) glucoză | 10 g |
| agar-agar pulvis | 15 g |

pH 5,4± 0,1 ; sterilizare prin autoclavare 15 minute la 121°C.

113. *Mediul Sabouraud modificat* (Candida)

| | |
|---|---|
| peptonă | 10 g |
| glucoză brută | 10 g |
| geloză | 27—28 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

Se ţin la autoclav cu capacul deschis pînă la realizarea unui amestec omogen, apoi se repartizează în baloane şi se sterilizează timp de 20 minute la 115°C. Înainte de turnarea mediului în plăci se adaugă chloramphenicol pulvis insolubil 0,5 g/l în mediul fierbinte.

114. *Mediul Shaidi-Ferguson perfringens agar* (Clostridium perfringens)

conţine adăugate la mediul de bază ajustat la pH± 7,6 pentru fiecare 1 000 ml mediu steril :

| | |
|---|---|
| soluţie 0,1% polimixină B | 3 ml |
| soluţie 0,12% kanamicină sulfat | 10 ml |

115. *Mediul Skirrow* (Campylobacter)

Geloză bază Oxoid nr. 2 la care se adaugă :

| | |
|---|---|
| vancomicină | 10 μg/ml |
| sulfat de polimixină B | 2,5 UI/ml |
| trimetoprim lactat | 5 μg/ml |
| sînge de cal | 7% |

116. *Mediul Stuart* (leptospire)

| | |
|---|---|
| asparagină | 0,13 g |
| thiamină | 0,020 g |
| $NH_4Cl$ | 0,27 g |
| $MgCl_2$ | 1,93 g |
| $Na_2HPO_4$ | 0,66 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,09 g |
| apă distilată | 900 ml |



Scanned with OKEN Scanner

pH-ul este ajustat la 7,3± 0,1 ; se adaugă ser de iepure proaspăt lipsit de anticorpi în concentrație de 1—10 ml la 100 ml mediu.

117. *Mediul sulfit — polimixină B sulfat — sulfadiazină — agar* (Clostridium perfringens)

| | |
|---|---|
| triptonă | 15 g |
| extract de drojdie | 10 g |
| agar | 15 g |
| citrat feric | 0,5 g |
| apă distilată | 1 000 ml |

pH = 7,0 ; sterilizare la 120°C pentru 20 minute. La fiecare litru de mediu răcit la 50°C, steril, se adaugă următoarele soluții sterilizate prin filtrare :

| | |
|---|---|
| soluție 5% de sulfit de sodiu | 5 ml |
| soluție 0,1% polimixină B-sulfat | 10 ml |
| soluție 1,2% sulfodiazină | 10 ml |

119. *Mediul sulfit — polimixină B sulfat — neomicină — agar* (Clostridium perfringens)

Are aceeași formulă ca mediul de bază de mai sus plus pentru fiecare 100 ml mediu steril răcit la 50°C se adaugă :

| | |
|---|---|
| soluție 5% sulfit de sodiu | 2 ml |
| soluție 4% D-cicloserină | 1 ml |

120. *Mediul TSI* (reacții biochimice ale Enterobacteriaceelor)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 3 g |
| extract drojdie | 3 g |
| peptonă din caseină | 15,5 g |
| peptonă din carne | 5 g |
| lactoză | 10 g |
| zaharoză | 10 g |
| D(+) glucoză | 1 g |
| citrat de fier (III) amoniacal | 0,5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| tiosulfat de sodiu | 0,5 g |
| roșu fenol | 0,024 g |
| agar-agar pulvis | 12 g |
| pH 7,4± 0,1 | |

Mediul se sterilizează 15 minute la 121°C, după care se repartizează în condiții de sterilitate în eprubete (12/120) și se înclină pe un suport pentru solidificare în poziție optimă (2/3 din mediu poziție dreaptă și o poziție înclinată).

120. *Mediul universal O.M.S.* (pentru întreținerea tulpinilor de colecție)

| | |
|---|---|
| lacto peptonă | 10 g |
| extract de carne | 3 g |
| clorură de sodiu | 3 g |
| agar pulvis | 10 g |
| apă distilată | 1 000 cm³ |

Se solvează ingredientele la cald, se filtrează prin vată ; se ajustează pH-ul la 7,2—7,4 ; se repartizează în eprubte și se sterilizează la autoclav la 120°C timp de 20 minute.



Scanned with OKEN Scanner

121. *Mediul nr. 1 universal* (pentru aerobi — anaerobi)

| | | |
|---|---|---|
| hidrolizat pancreatic din cazeină | 15 g | |
| extract drojdie | 5 g | |
| dextroză | 5,5 g | |
| agar-agar | 0,75 g | |
| L-cistină | 0,6 g | (L+cisteină) |
| clorură de sodiu | 2,5 g | |
| acid tioglicolic sau | 0,3 g | |
| tioglicolat de sodiu | 0,5 g | |
| resazurină | 0,001 g | |
| apă distilată ad | 1 000 ml | |

pH 7,2± 0,1

Repartizare cîte 15 ml în eprubete 16/160 și autoclavare 15 minute la 121°C. Pentru utilizare numai pentru anaerobi se pipetează ulei de parafină steril pentru mediu (înălțime 1 cm).

122. *Mediul Vogel — Johnson* (mediu selectiv pentru Staphylococcus aureus)

| | |
|---|---|
| peptonă din cazeină | 10 g |
| extract drojdie | 5 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 5 g |
| manită | 10 g |
| clorură de litiu | 5 g |
| glicină | 10 g |
| roșu fenol | 0,025 g |
| agar-agar pulvis | 13 g |

pH 7,2± 0,2 ; sterilizare prin autoclavar la 121°C. Înainte de turnare în plăci Pétri mediul se răcește la aproximativ 50°C și se adaugă 20 ml din soluție 1% telurit de potasiu sterilizată prin filtrare. Stafilococii aurii cresc sub formă de colonii mici negre cu o zonă exterioară gălbuie.

123. *Mediul VL — lichid* (Béerens și Nahon-Castel) (mediu ca bază pentru fermentara zaharurilor și reacția indolului) (anaerobi nesporulați)

| | |
|---|---|
| peptonă triptică | 10 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| extract de carne | 2 g |
| extract drojdie | 5 g |
| clorhidrat de cisteină | 0,3 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

pH 7,4± 0,1 ; se repartizează în eprubete de 16/160 mm sau 18/180 mm cîte 15 ml mediu, se acoperă cu ulei de parafină și în final sterilizare 20 minute la 115°C.

124. *Mediul Willis — Hobbs* (Clostridium perfringens)

| | | |
|---|---|---|
| a) geloză 2% | 600 $cm^3$ | |
| roșu neutru sol. 1% | 2 $cm^3$ | |
| lactoză | 7,2 g | |

Se fierbe 30 minute ; se adaugă 24 $cm^3$ emulsie gălbenuș de ou în ser fiziologic; 90 $cm^3$ lapte degresat sterilizat ; se amestecă bine ; se toarnă în plăci.



Scanned with OKEN Scanner

b) Mediul Willis — Hobbs modificat :

| | |
|---|---|
| geloză nutritivă 2% | 940 $cm^3$ |
| lactoză | 12 g |
| roșu neutru sol. 1% | 3,25 $cm^3$ |

La acest mediu de bază răcit la 50°C se adaugă 30 $cm^3$ emulsie gălbenuș de ou în ser fiziologic și 2 $cm^3$ soluție 1% neomicină.

125. *Mediul Wilson — Blair* (pentru Salomonella)

| | |
|---|---|
| extract de carne | 5 g |
| peptonă din carne | 10 g |
| D(+) glucoză | 5 g |
| sulfat de fier (II) | 0,3 g |
| monohidrogenfosfat de sodiu | 4 g |
| verde briliant | 0,025 g |
| indicator bismut-sulfit (sulfit de sodiu 4,5 g, citrat bismut amoniacal 0,7 g, clorură de sodiu 3 g) | 8 g |
| agar-agar pulvis | 15 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |
| pH 7,6 ± 0,1 | |

Mediul se poate prepara sub formă de geloză nutritivă la care se adaugă înainte de repartizare în plăci Pétri indicatorul bismut-sulfit, verdele briliant și sulfat de fier (II). Pe acest mediu se efectuează însămînțări cu ansa din mediile de îmbogățire (exemplu, bulion-selenit, bulion-tetrationat). Termostatare 48 ore la 37°C. Salmonella : colonii negre cu luciu metalic.

126. *Mediul XLD* (xiloză — lizină — desoxicolat — agar) (pentru Salmonella)

| | |
|---|---|
| D(+) xiloză | 3,5 g |
| L+ lizină | 5 g |
| lactoză | 7,5 g |
| zaharoză | 7,5 g |
| clorură de sodiu | 5 g |
| extract de drojdie | 3 g |
| desoxicolat de sodiu | 2,5 g |
| tiosulfat de sodiu | 6,8 g |
| citrat de fier (III) amoniacal | 0,8 g |
| roșu fenol | 0,08 g |
| agar-agar pulvis | 13,5 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |
| pH 7,4 ± 0,1 | |

Mediul nu se autoclavează ; ingredientele se fierb pînă se gelifică agarul.

Colonii roșii : S. paratyphi, S. choleræ suis, S. pullorum, S. gallinarum, Shigella, Providencia, uneori Pseudomonas și Proteus rettgeri ;

Colonii roșii : rare Salmonella, Arizona, Edwardsiella ; cu centrul negru



Scanned with OKEN Scanner

Colonii galbene : Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Alkalcens-dispar, Proteus (exceptînd Proteus rettgeri)

*SOLUȚII*

1. *Ser fiziologic*

Clorură de Na — se solvează în cantități de 8,5 g la 1 000 ml apă distilată, la rece. Dacă este nevoie se filtrează prin vată, apoi se autoclavează la 120°C timp de 30 minute.

2. *Soluție fiziologică peptonată*

| | |
|---|---|
| clorură de sodiu | 8,5 g |
| peptonă | 1 g |
| apă | 1 000 ml |

Sterilizarea la autoclav, la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

3. *Apă de robinet sterilă*

Sterilizare la autoclav, la temperatura de 120°C timp de 20 min.

4. *Hidroxid de sodiu, soluție 10%*

Soluția de hidroxid de sodiu se sterilizează la autoclav la temperatura de 120°C timp de 15 minute.

5. *Acid clorhidric, soluție 20%*

Soluția de acid clorhidric se sterilizează la autoclav la temperatura de 120°C timp de 15 minute.

6. *Ulei de parafină*

Ulei de parafină se sterilizează în etuvă la temperatura de 180°C timp de 60 minute.

7. *Soluție de clorură ferică*

| | |
|---|---|
| clorură ferică | 10 g |
| acid clorhidric (d = 1,19) | 5 ml |
| soluție 1% | |
| apă | 100 ml |

Se dizolvă clorura ferică în apă și se adaugă acidul clorhidric.

8. *Tergitol*

| | |
|---|---|
| tergitol 7 | 10 g |
| apă | 100 ml |

Se dizolvă tergitolul în apă, se ajustează pH-ul la 7,0 și se sterilizează la temperatura de 121°C timp de 15 minute.

9. *Soluție albastru de metilen*

50 mg albastru de metilen se introduc cantitativ, cu apă, într-un balon cotat de 1 000 ml și se aduce la semn cu apă. Păstrare la întuneric și la rece (frigider), maximum 30 zile de la preparare în butelii de culoare brună.

10. *Soluție Calberia*

| | |
|---|---|
| glicerină | 5 ml |
| alcool 95% | 10 ml |
| apă distilată | 15 ml |
| soluție apoasă de fucsină | 2 picături |

11. *Soluție glicerină Erdhman*

Soluția I :

| | |
|---|---|
| gelatină | 5 g |
| apă distilată | 19 ml |

Soluția II :

| | |
|---|---|
| glicerină 82% | 33 g |
| fenol cristale | 1 g |

Apei distilate la fierbere i se adaugă gelatina, soluția II 10 picături fucsină și se filtrează prin vată de sticlă.

12. *Soluție citrat de sodiu*

Soluție citrat de sodiu 2% sterilă, diluant :

20 g citrat de sodiu se dizolvă în 1 000 ml apă și se sterilizează la 120°C timp de 15 minute.

13. *Soluție tampon fosfat*

Soluția tampon fosfat pH — 7, diluant : se prepară prin amestecul a două soluții — A și B.

Soluția A : (soluție monohidrogenfosfat de sodiu) :

| | |
|---|---|
| ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 11,876 g |
| apă | 1 000 ml |

Soluția B (soluție dihidrogen fosfat de potasiu) :

| | |
|---|---|
| Dihidrogen fosfat de potasiu ($KH_2PO_4$) | 9,078 g |
| apă | 1 000 ml |

Cele două soluții A și B se sterilizează separat la temperatura de 120°C timp de 15 minute. Se păstrează separat. În momentul folosirii se amestecă : soluția A — 7 volume+soluția B — 3 volume.

14. *Soluție fosfat de potasiu bibazic*

Soluție fosfat de potasiu bibazic 2% sterilă, diluant :

20 g fosfat de potasiu se dizolvă în 1 000 ml apă și se sterilizează la 120°C timp de 15 minute.

15. *Soluție lactofenol Amman*

| | |
|---|---|
| acid lactic | 20 g |
| acid fenic cristale | 20 g |
| apă distilată | 20 ml |
| glicerină | 40 g |

Se încălzesc substanțele pentru dizolvarea lor completă. Pentru colorare se adaugă 0,05 g albastru de metilen sau eozină. Se păstrează în sticle brune.

16. *Soluție Lugol*

| | |
|---|---|
| iod cristale | 1 g |
| iodură de potasiu | 2 g |
| apă distilată | 300 ml |

Celule apar colorate în roșu datorită conținutului lor în glicogen.

17. *Soluție Tampon Fosfatat (diluant)* (F.R.IX) pH 7

| | |
|---|---|
| dihidrogen de potasiu | 10,893 g |
| monohidrogenfosfat de sodiu | 21,36 g |
| apă distilată ad | 1 000 ml |

Sterilizare la autoclav 15 minute la 121°C.

18. *Soluție Tamponat Fosfatat* (diluant) (F.SUA XVIII)

a) soluție de bază :

35 g dihidrogenfosfat de potasiu se dizolvă în aproximativ 5 000 ml apă distilată ; se corectează pH-ul la 7,2± 0,1 cu NaOH 10% după care se completează cu apă distilată pînă la 1 000 ml.



Scanned with OKEN Scanner

b) soluția de lucru :

soluția de bază se diluează 1 : 800 cu apă distilată ; sterilizare la autoclav 15 minute la 121°C.

19. *Soluție peptone — fosfat — Tween 20* (diluant)

| | |
|---|---|
| peptonă triptică | 1,7 g |
| peptonă de soia | 0,3 g |
| clorură de sodiu | 0,5 g |
| monohidrogenfosfat de potasiu | 0,25 g |
| dextroză | 0,25 g |
| Tween 20 (polysorbat) | 50 ml |
| apă distilată | 1 000 ml |

Ingredientele se dizolvă în apă distilată încălzită la 48—50°C după care diluantul se autoclavează 20 minute la 121°C.

20. *Reactiv Kovacs*

| | |
|---|---|
| p-Dimetilaminobenzaldehidă ($C_9H_{11}ON$) | 5 g |
| alcool amilic sau butilic | 75 ml |
| acid clorhidric (d = 1,19) | 25 ml |

Se dizolvă p-dimetilaminobenzaldehida în alcool amilic sau butilic la 60°C, se adaugă acidul clorhidric, picurînd sub agitare continuă, se lasă în repaus pînă ce soluția se colorează în galben (aproximativ 7 h), se introduce în butelii de sticlă de culoare brună.

Scanned with OKEN Scanner

# Indice alfabetic


A

Acid clorhidric, soluție 20% 363
Absorbția virusurilor pe diferite substraturi biologice 123
— — — filtre microporoase 120
— — — pulberi insolubile 122
— — — săruri anorganice precipitabile 123
Agar-albastru de bromtimol-lactoză (AABTL) 329
Agar-cazeină-amidon 330
Agar-cărbune-extract de drojdie 330
Agar-citrat-azidă de sodiu-bilă-esculină 330
Agar de acoperire 329
Agar-dezoxicolat-citrat-lactoză (ADCL) 330
Agar-dezoxicolat-citrat-manitol 331
Agar-glucoză-azidă de sodiu — TTC 331
Agar-glucoză-cartof 332
Agar Lefson (modificat de Heynes) 332
Agar-lizină-arginină 332
Agar-malț 333
Agar-manită-gălbenuș de ou-polimixină 333
Agar-manitol-roșu fenol 333
Agar-peptonă triptică-dextroză-purpur de bromcrezol 334
Agar-săruri biliare 334
Agar-sînge 334
Agar-sulfit de sodiu 334
Agar-taurocolat-gelatină ($B_2$) 334
Agar-taurocolat-telurit-gelatină ($B_4$) 334
Agar-tiosulfat-citrat-bilă-sucroză ($B_3$) 335
Agar-triptonă cu sulfit de sodiu, polimixină B și neomicină 335
Alterarea cărnii 200
— — de pasăre 202
— cerealelor 205
— fructelor 203
— laptelui și lactatelor 204
— legumelor 202
— ouălor 203
Alterarea peștelui 202
— preparatelor de carne 201
— produselor alimentare 198
Amplasarea punctelor de recoltare a probelor de sol 155
Analiza bacterioscopică a conservelor 243
— biologică a apei 130
— micologică a alimentelor 265
— microbiologică a adjuvanților și condimentelor 239
— — — apei 63
— — — băuturilor 247
— — — cărnii conservate și a preparatelor din carne 236
— — — — și peștelui 230
— — — conservelor 242
— — — fructelor congelate 258
— — — laptelui și derivatelor 216
— — — legumelor și fructelor 257
— — — maionezei 246
— — — ouălor 245
— — — pîinii, făinii și cerealelor 256
— — — prafului de ouă 246
— — — produselor de cofetărie și patiserie 254
— — — — farmaceutice 284
— — — — zaharoase 252
— — — saramurilor și soluțiilor 239
— — — solului 155
— — — zahărului 250
— — propriu-zisă a produselor cosmetice 298
— parazitologică a cărnii și produselor de carne 237
— prin culturi a conservelor 243
— trichineloscopică a cărnii 237
— virusologică a produselor alimentare 261
Apa potabilă 136
Apă de robinet sterilă 363
— peptonată alcalină 335
— — pentru reacția indolului 335
— — tamponată 336
— — telurit-taurocolat 336
— — 1% 336
— — 1% + 1% TTC 336




Scanned with OKEN Scanner

Apele de suprafață 44
— meteorice 43
— subterane 43

## B

*Bacillus cereus* din lapte 222
Bacteriile coliforme ca indicatori sanitari ai contaminării fecale a alimentelor 210
— din alimente 180
— — genul *Proteus* ca indicatori 213
Bacterii folosite ca indicatori de contaminare fecală a alimentelor 209
— sporulate anaerobe din lapte 223
Bacteriofagii enterici 58
Bacterioscopia cărnii 231
Băuturile alcoolice 248
— nealcoolice 247
— slab alcoolice (fermentabile) 249
— tari spirtoase (distilate) 249
Bulion-acetamidă 336
Bulion-azolecitină-Tween 20 337
Bulion bilă-lactoză-verde briliant (BBLV) 337
— Blaser 338
— de azidă de sodiu-bromcrezol purpur 337
— — — — sodiu simplu și dublu concentrat 337
— — îmbogățire (III) 344
— — preîmbogățire 342
— glucoză-azidă de sodiu-etil violet 338
— glucozat cu ficat sau carne fiartă 339
— glucoză-fosfat pentru reacțiile R-M și V.P. 338
— G.N (Hanja) 339
— Hottinger 339
— lactozat 339
— lauril sulfat simplu și dublu concentrat 340
— Mac Conkey 340
— malonat 340
— manită 340
— nutritiv 340
— — cu emulsie de gălbenuș de ou și polimixină B, simplu și dublu concentrat 341
— Oosterom modificat 341
— pentru clostridii sulfito-reducătoare, simplu și dublu concentrat 338
— — decelarea ureazei 344
— peptonă--sorbitol-săruri biliare 341
Bulion-peptonă triptică-dextroză 341
Bulion selenit-cistină 342
— selenit de sodiu 342
— — — stronțiu 343
— sorbitol-săruri biliare 342
— tetrationat de potasiu conform formulei lui Preuss 343
— — Müller-Kauffman 343
Bulion tripticar 343
— VF cu acid tioglicolic și albastru de metilen 344

## C

Cercetarea spectrului microbiologic al produsului cosmetic 299
Citirea lizei bacteriofagice 94
Clostridiile sulfito-reducătoare 214
Concentrarea cu ajutorul polietilenglicolului 38
— particulelor virale pentru analiza virusologică a produselor alimentare 263
— virusurilor din probele de apă 120
— — — — — sol 173
Condiții de calitate microbiologică a cărnii 240
— — — pentru apa potabilă 137
Conservarea prin acidifiere 259
— probelor de apă 131
Contaminarea animal-sol-om 149
— obiectelor cu agenți patogeni 27
— om-sol-om 148
— sol-om 149
— suprafeței cutanate 29
Controlul eficienței pasteurizării 227
— microbiologic al eficienței dezinfecției mîinilor 320
— — — personalului sanitar 323
— — — produselor alimentare 206
— — — respiratoarelor 325
— — — sistemului de împachetare și păstrare a materialelor sanitare sterile 319
— — — sterilizării 310
— — — modificatoarelor și tubulaturii pentru administrarea oxigenului 325
— purității microbiologice a preparatelor farmaceutice 290
— sterilității materialelor sanitare utilizate în tehnicile aseptice 316
— sterilizării cu aer cald 312
— — — oxid de etilen, formol sau radiații ionizante 315
— — la autoclave cu abur sub presiune 310

## D

Decelarea prezenței genului *Campylobacter* 111
— genului *Shigella* 103
— prezenței genului *Salmonella* 98
— — leptospirelor 116
— — speciei *Legionella pneumophila* 113
— — — *Yersinia enterocolitica* 108
— — vibrionilor holerici de grup 0 : 1 și vibrionilor holerici de grup non 0 : 1 105



Scanned with OKEN Scanner

Decontaminarea probelor de sol 174
Determinarea activității bacteriostatice și fungistatice a produselor farmaceutice 285
— bacilului *Antracis* în sol (Strauch) 166
— bacteriilor coliforme în carne 232
— bacteriofagilor enterici din sol 162
— *Brucella* din lapte 225
— cantitativă a bacteriofagilor enterici din apă 92
— — — clostridiilor anaerobe sulfito-reducătoare și a speciei *Clostrium perfringens* în apă și nămol 85
— — — coliformilor totali și fecali din apă 66
— — — streptococilor fecali în apă 80
— — — virusurilor din probele concentrate 124
— clostridiilor sulfito-reducătoare în carne 233
— *clostridium tetani* în sol 165
— coliformilor din aer 35
— coliformilor fecali 71
— — — în probele de sol 160
— — totali în probele de sol 159
— dermatofiților din sol 168
— enterobacteriilor patogene din sol 163
— *Esch. coli* în carne 233
— factorilor inhibitori din lapte 228
— florei mezofile 34
— fungilor de pe suprafețe 41
— — din aer 35
— — patogeni din sol 168
— genului *Candida* din aer 37
— geohelminților din sol 170
— germenilor din genul *Mycobacterium* în lapte 224
— — — — *Proteus* în carne 233
— — — — *Salmonella* în lapte 221
— — mezofili din sol 158
— — patogeni în carne 234
— — psihrofili din sol 159
— — sporulați cu poartă de intrare cutanată 165
— — sulfito-reducători din sol 161
— — termofili din sol 159
— indicatorilor biologici 41
— — microbiologici 34
— numărului de *Bacillus cereus* în carne 233
— — — drojdii și mucegaiuri din lapte 226
— — — germeni din sol 158
— — — — sub formă de spori din sol 159
— — — stafilococi coagulazo-pozitivi în carne 235
— — probabil de *Clostridium perfringens* în lapte 223
Determinarea numărului probabil de coliformi totali și *Esch. coli* 293
— — total de bacterii aerobe ce se dezvoltă la 22°C și 37°C 65
— — — — germeni în carne 232
— — — — — — lapte 217
— — — — unități formatoare de colonii 291
— prezenței bacteriilor din genul *Salmonella* în carne 234
— — Candidei în apă 126
— — genului *Candida* în sol 166
— — helminților în apă 129
— stafilococilor din aer 34
— streptococilor fecali (enterococi) în probele de sol 161
— — hemolitici din aer 34
— umidității solului 157
— virusurilor din aer 37
— — — sol 172
Drojdiile 189

E

Efectuarea diluțiilor din probele de apă 65
Eluarea virusurilor adsorbite pe particulele de sol 172
Enterococii 55
— ca indicatori sanitari de contaminare fecală 211
Etapa de confirmare biochimică a salmonelelor 100
— — — serologică a salmonelelor 100
— — dispersie și izolare a salmonelelor 99
— — îmbogățire a salmonelelor 99
Examenul cantitativ ca indicator microbiologic sanitar 207
— micologic calitativ 267
— — cantitativ 265
— microbiologic al cerealelor 257
— — — făinii 256
— — — fructelor congelate 258
— — — pîinii 256
— — — zahărului 250

F

Flora mezofilă din aer 24
— microbiană telurică 145
Fungii : drojdiile și mucegaiurile 189

G

Geloza 2% Martin 345
Geloză lactozată cu fuxină și sulfit de Na (Endo) 345



Scanned with OKEN Scanner

Geloză-lactoză-eozină-albastru de metilen (GEAM, Levine) 344
Geloză nutritivă 346
— — glucozată 346
— tioglicolat după Brewer 346
— verde briliant 346
Germenii anaerobi sulfito-reducători 56
— din grupul coliform 25, 55
— patogeni din lapte 221

H

Hidroxid de sodiu, soluție 10% 363

I

Identificarea *candidei albicans* 126
— laptelui mastic 227
— prezumtivă a coloniilor de *Legionella pneumophila* 115
— sporilor de fungi 36
— virusurilor în probele concentrate 124
— — în probele de sol 174
Incubarea și citirea probelor pentru controlul sterilității 318
Indicatorii bacteriologici de contaminare a aerului 24
— direcți ai poluării biologice 152
— indirecți ai poluării biologice 153
— sanitari de poluare microbiologică 152
— — microbiologici pentru aprecierea produselor alimentare 206
Indicații de control al sterilității 319
Interrelații ecologice aliment-microorganisme 194
Izolarea primară a speciei *Legionella pneumophila* pe medii nutritive 114
— — — — — — prin metoda biologică 115
— virusurilor din probele concentrate 124
— — — — de sol 174

Î

Îmbogățirea cu tulpini test 93
Însămînțarea probelor 116
— — de apă 65, 83, 92

L

Lacurile de acumulare 46
Legumele și fructele proaspete 257
— uscate, deshidratate 258
Levurile sau drojdiile 189

M

Medii de cultură 329
— pentru *Brucella* 348
Mediul agar-zaharoză (Leuconostoc) 354
— albumină Tween 80 modificat de Johnson & Harris 347
— Baird Parker 350
— Béerens 345
— — și Nahon-Castel 361
— Butzler 348
— Campy BAP 348
— — IC 348
— CETRIMID-AGAR 348
— Chapman 352, 353
— CHO 348
— cu alcool 3% 347
— — citrat (Simmons) 349
— — fenilalanină 351
— Dorset 349
— DRCA (agar-glucoză-amidon-sulfit-cisteină) cu neomicină și polimixină 350
— Dr. Leuconostoc 354
— Endo 345
— ETGPA-Baird-Parker 350
— Giolitti Cantoni 351
— hiperclorurat lichid 352
— — sodiu 352
— — solid (Chapman) (varianta I C) 353
— Istrati-Meitert 353
— Korthof 353
— Koser 353
— lapte steril 354
— Lödder I 354
— — II 355
— Mac Conkey 355
— mCp 349
— MILF (mobilitate-indol-lizindecarboxilază-fenilalanin-dezaminază) 355
— MIU (mobilitate, indol, uree) 355
— Möller pentru decarboxilarea lizinei 356
— Nikerson-Mankowski 356
— nr. 1 universal 361
— Pankov 358
— PC 358
— PCB 358
— pentru fermentarea hidraților de carbon 352
— peptonă-sulfit de fier-agar 356
— — triptică-extract de drojdie-glucoză-agar 358
— *Pseudomonas*-agar F 358
— — agar P 358
— Sabouraud 1% glucoză-maltoză-agar 359
— — lichid 358
— — modificat 359
— Shaidi-Fergusson *perfringens* agar 359

Mediul Simmons 349
— Skirrow 359
— Slanetz-Bartley 331
— Stuart 359
— sulfit-polimixină B sulfat-neomicină-agar 360
— sulfit-polimixină B sulfat-sulfatdiazină-agar 360
— Tagler 356
— TSI 360
— universal O.M.S. 360
— VL-lichid (Béerens și Nahon-Castel) 361
— Vogel-Johnson 361
— Willis-Hobbs 361
— Wilson-Blair 362
— XLD (xiloză-lizină-dezoxicolat-agar) 362
Metoda amprentelor 40
— Bailenger 171
— concentrării 170
Metoda decelării calitative și cantitative a speciei *Pseudomonas aeruginosa* din apele potabile, apele minerale și apele clorinate din piscine 96
— de recoltare a aerului prin sedimentare (Koch) 31
— diluțiilor în tuburi 292
— electroprecipitării 34
— Kato și Miura 171
— Koch 36
— membranei filtrante 74
— — — pentru unități formatoare de colonii 293
— peliculelor adezive 40
— plăcii turnate 292
Metoda spălării 40
— tamponului 39
— tuburilor multiple 66
— Willis-Hung 171
Metode de determinare a germenilor indicatori de poluare fecală a solului 159
— — — — — patogeni din sol 163
— — investigare virusologică a apei 118
— — numărare a speciei *Clostridium perfringens* din apă 91
— — recoltare a probelor de aer 30
— rapide de detectare a coliformilor 78
Metodele de barbotare 33
— — filtrare 32
— — impact 33
— — recoltare a aerului prin aspirație 32
Microbiologia produselor cosmetice 296
Microflora dominantă în alterarea cărnii, preparatelor de carne, a păsărilor și a peștelui 199
— dominantă în alterarea unor alimente 198
— patogenă din alimente 179
— saprofită din alimente 178
Microflora telurică 145
Microorganisme întîlnite în alimente 180
Microorganismele din produsele de cofetărie și patiserie 253
— din produsele zaharoase 252
— patogene din produsele de cofetărie și patiserie 254
— patogene transmisibile prin apă 47
— — — — —, bacterii 48
— — — — —, fungi 51
Microorganismele patogene transmisibile prin apă, helminți 52
— — — — —, protozoare 51
— — — — —, virusuri 47
Mierea 255
Mucegaiurile 190

## N

Nematode 52
Norme pentru produsele farmaceutice 283
Notarea probelor de apă 64
Nucleii din picătură 19
Numărarea organismelor 132
Numărul probabil de bacterii coliforme în lapte 219
— — — *Esch.coli* fecali în lapte 220
— total de germeni din aer care se dezvoltă la 37°C 24
— — — — — apă 54

## O

Ouăle proaspete 245
Originea contaminării produselor farmaceutice 282

## P

Parazitozele transmise prin sol 150
Paraziți transmiși prin alimente 192
Păstrarea probelor de apă 64
— — — sol 156
Permetabilitatea pentru aer a solului 144
— — apă a solului 144
Picăturile de secreție nazală, buco-faringiană sau bronșică 19
Poluarea biologică a apei 46
— chimică a solului 151
Poluarea microbiană a solului 148
Praful contaminat 21
Precontrolul mediilor de cultură 284
Pregătirea diluțiilor de sol 156
Prelevarea probelor 291
Prelucrarea probelor de aer 38
— — — alimente din produse alimentare 261



Scanned with OKEN Scanner

Prelucrarea probelor de sol 155, 156
Principalele boli aerogene 16
Principalii germeni izolați din produsele farmaceutice 282
Proba reductazei pentru lapte 227
— termostatării conservelor 242
Produsele de cofetărie și patiserie 253
Proveniența germenilor patogeni din aer 18
*Pseudomonas aeruginosa* 59
Pulberea bacteriferă 21
Purificarea materialului de flora microbiană 264

R

Reactiv Kovacs 365
Recoltarea apei 63
— probei pentru analiză din conserve 243
— — de aer 37
— — — apă pentru analiza virusologică 119
— — — carne și pește 230
— — — lapte 216
— — — sol 155, 156
— — pentru controlul sterilității 317
— și însămînțarea germenilor de pe suprafețele cutanate 39
— — pregătirea probelor de produse cosmetice 297
Rolul și semnificația microorganismelor în alimente 178
— apei în organism 42

S

Selectivitatea solului 145
Separarea în sisteme lichide cu fază dublă 123
Ser fiziologic 363
Soluție albastru de metilen 363
— Calberia 363
— citrat de sodiu 364
— de clorură ferică 363
— fiziologică peptonată 363
— fosfat de potasiu bibazic 364
— glicerină Erdhman 363
— lactofenol Amman 364
— Lugol 364
— peptone-fosfat Tween 20 (diluant) 365
Soluție Tamponat Fosfatat (diluant) (F. SUA XVIII) 364
— Tampon Fosfatat (diluant) (F. R. IX) 364
— tampon fosfat 364
Soluții 363
Stabilirea numărului probabil de bacteriofagi coli și Typhic Vi 95
— — — — coliformi fecali în apă 74
— — — — — totali din apă 68
— — — — streptococi fecali 81
Stabilitatea virusurilor în alimente 188
Stafilococii 24
— coagulazo-pozitivi din lapte 222
— fecali 55
Streptococii hemolitici (β-hemolitici) și viridans (α-hemolitici) 24, 26

T

Tehnica diseminării în placă 84
— examenul helmintologic al legumelor și fructelor 260
— imunofluorescenței directe 114
— încorporării în placă 82, 90
— inoculării în tuburi 89
— însămînțării 126
— membranei filtrante 83, 90
Temperatura solului 145
Testarea lizei bacteriofagice 93
Test de confirmare pentru coliformi totali 293
— — — — *Esch.coli* 294
— rapid orientativ pentru *Esch. coli* 294
Tergitol 363
Test prezumtiv pentru coliformi totali 293
Testul de confirmare 67, 80
— — filamentare 127
— — formare a clamidosporilor 126
— — identificare pentru *Escherichia coli* 71
— — prezumție 67, 80
Transportul probelor de apă 64
— — — — de suprafață 131
— — — sol 156

U

Ulei de parafină 363

V

Virusuri transmise prin alimente 185

Scanned with OKEN Scanner

ISBN 973-39-8820-6

Lei 42

Scanned with OKEN Scanner